

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

BP

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
6. September 2002 (06.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/068636 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/11,  
C07K 14/515, C07H 21/02, A61K 38/17, C12N 1/21

(74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.; Maybachstrasse  
6A, 70469 Stuttgart (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/00859

(22) Internationales Anmeldedatum:  
28. Januar 2002 (28.01.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 09 466.3 28. Februar 2001 (28.02.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Aus-  
nahme von US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT  
ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN  
FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54,  
80636 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRUNNER, Herwig  
[DE/DE]; An der Betteleiche 6, 70569 Stuttgart (DE).  
KOCH-PELSTER, Brigitte [DE/DE]; Forststrasse 49,  
12163 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHODS AND AGENTS FOR MODIFYING HUMAN ANGIOGENESIS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND MITTEL ZUR MODIFIKATION HUMANER ANGIOGENESE

(57) Abstract: The invention relates to methods and agents for modifying human angiogenesis, whereby the agents used in these methods can be nucleic acids, nucleic acid complexes (angiotropin) or antibodies that are directed against these nucleic acids or nucleic acid complexes.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Modifikation humaner Angiogenese, wobei die in diesen Verfahren eingesetzten Mittel Nucleinsäuren, Nucleinsäurekomplexe (Angiotropin) oder Antikörper dagegen sein können.

WO 02/068636 A1

-1-

## Verfahren und Mittel zur Modifikation humaner Angiogenese

### 5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft RNA-Bestandteile eines Metallo-Ribonucleoprotein-Morphogens aus Leukocyten, Verfahren zu deren Herstellung und Charakterisierung sowie diese RNA-Bestandteile aufweisende Nucleinsäure-Komplexe und Verfahren zu deren Verwendung, insbesondere Verfahren und Mittel zur Modifikation der Angiogenese und Verfahren und Mittel zur Tumorzellbekämpfung.

Unter Angiogenese versteht man die Ausbildung neuer Blutgefäße durch das Aussprossen von Kapillaren aus einem bereits bestehenden Gefäßsystem (Hertig, 1935). Die im Rahmen der Angiogenese stattfindende Neovaskularisierung erfolgt in mehreren Teilschritten (Folkman und Shing, 1992). Dabei wird zunächst die die Blutgefäße umgebende Basalmembran mit Hilfe verschiedener proteolytischer Enzyme, zum Beispiel Kollagenase, abgebaut und zusätzlich wird die extrazelluläre Matrix im perivaskulären Raum fragmentiert. Anschließend erfolgt die Differenzierung der Endothelzelle, wobei sich die Zellmorphologie ändert und damit verbunden Pseudopodien ausgebildet werden. Angiogene Stimuli bewirken, dass die freigelegten Endothelzellen in Richtung eines chemotaktischen Reizes migrieren. Anschließend erfolgt eine Proliferation der Endothelzellen. Durch die Aneinanderlagerung der Außenwände einer oder mehrerer Endothelzellen werden neue Gefäßschleifen mit einem

-2-

kapillarförmigen Lumen ausgebildet. Danach setzt die Synthese einer neuen Basalmembran ein. Sobald zwei Kapillarsprossen an der Spitze miteinander verschmelzen und ein gemeinsames Lumen bilden, ist  
5 die Ausbildung eines neuen funktionsfähigen Kapillarsystems abgeschlossen und der Blutfluss kann einsetzen. Unter nicht-pathologischen Bedingungen treten beim erwachsenen Mann, abgesehen von der Wundheilung, nahezu keine angiogenetischen Prozesse  
10 auf, so dass sich das Endothel nur wenige Male im Leben erneuert. Bei der erwachsenen Frau ist die Situation jedoch völlig anders, da insbesondere im Rahmen des Menstruationszykluses, das heißt während der Ovulation, der Reifung des Corpus luteum und  
15 des Aufbaus des Endometriums, bis zur Menopause angiogenetische Prozesse stattfinden. Während der Schwangerschaft tritt Angiogenese verstärkt auf, insbesondere bei der Plazentabildung und der Laktogenese in den Mammæ (Hertig, 1935).

20 Neben der physiologisch essentiellen Angiogenese gibt es auch eine Vielzahl pathologischer angiogenetischer Prozesse (Folkman, 1995a). Zu diesen gehören beispielsweise die diabetische Retinopathie, die verschiedenen Formen von rheumatoider Arthritis  
25 und die Ausbildung von Hämangiomen. Diese pathologischen Prozesse werden dadurch verursacht, dass angiogenetisch stimulierende Faktoren, wie zum Beispiel Metalloproteasen, gegenüber ihren Inhibitoren, beispielsweise TIMP (tissue inhibitor of metalloproteases), im Überschuss vorliegen. Durch gezielte Inhibition einzelner Angiogenese-Faktoren  
30 versucht man solche pathologischen angiogenetischen Prozesse zu inhibieren (Adamis et al., 1996). Ein

Spezialfall der pathogenen Angiogenese stellt die Tumorangiogenese dar (Folkman 1971, Folkman 1995b). Beim Tumorwachstum sezernieren die Tumorzellen selbst angiogene Faktoren, die chemotaktisch die  
5 Aussprossung neuer Blutgefäße in Richtung des Tumors induzieren. Durch eine erhöhte Anzahl von Blutgefäßen kann der Tumor verstärkt mit lebensnotwendigen Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Dies hat wiederum ein verstärktes Tumorwachstum zur Folge. Ein zur Zeit rasch expandierendes  
10 Forschungsgebiet innerhalb der Tumorforschung stellt daher die Anti-Angiogenese-Forschung dar. Auch hier wird nach Faktoren gesucht, die die Tumorangiogenese und damit auch gleichzeitig das Tumorstadium  
15 wachstum inhibieren (Folkman 1995a, Folkman 1995b).

Von Angiotropin, einem aus ischämischen Herzmuskelgewebe, Wundflüssigkeit und den Überständen serumfreier Massenkulturen Lektin-stimulierter porciner Leukozyten isolierten Metallo-Ribonucleoprotein-  
20 Morphogen, ist bekannt, dass es ein Mediator angiogenetischer Prozesse ist (Wissler und Renner 1981, Wissler 1982, Wissler 1984). Die angiogenetische Wirksamkeit von Angiotropin wurde mit Hilfe üblicher in vivo- und in vitro-Testsysteme nachgewiesen. So konnte beispielsweise mittels eines Tests  
25 an Corioallantois-Membranen des Hühnerembryos (CAM-Test) gezeigt werden, dass nach Verabreichung von Angiotropin eine verstärkte Kapillarisierung in dieser Membran erfolgte (Wissler 1982, Noll 1998,  
30 Kuhn 1998). Eine verstärkte Vaskularisierung wurde auch bei der intradermalen Injektion von Angiotropin am Kaninchenohr beobachtet (Höckel et al. 1984, Höckel 1988). Im Endothelzell-Test konnten nach

- 4 -

Verabreichung von Angiotropin zeit- und dosisabhän-  
gige Änderungen der Zellmorphologie von ursprüng-  
lich kontaktinhibierten konfluenten Endothelzellen  
beobachtet werden, wobei diese Änderungen in drei  
5 Stufen erfolgten (Höckel et al. 1986, Höckel 1988,  
Noll 1998). Im Stadium I, das heißt innerhalb von  
zwei bis drei Tagen, nahmen die ursprünglich fla-  
chen polygonalen Endothelzellen eine abgerundete,  
bipolare, parallel orientierte Form an. Dabei bil-  
10 deten sich in verstärktem Maße Pseudopodien und Va-  
cuolen aus. Im Stadium II, das heißt nach etwa etwa  
vier bis sieben Tagen, waren lange bipolare Cy-  
toplasma-Ausläufer mit tubulären Strukturen zu beo-  
bachten, die sich spatial organisierten. Innerhalb  
15 der Endothelzellen waren dabei eine oder zwei große  
transparente Vakuolen mit beweglichen Granula vor-  
handen. Wenn die Endothelzellen weiterhin mit Angi-  
otropin-haltigem Medium stimuliert wurden, gingen  
sie in Stadium III über. Dabei verschwanden die Va-  
20 kuolen und es traten unregelmäßig geformte Partikel  
außerhalb des Zellkörpers und der Pseudopodien auf.  
Wurden Endothelzellen im Stadium II mit neuem Medi-  
um, das kein Angiotropin enthielt, weiterkulti-  
viert, bildeten sich die zellmorphologischen Verän-  
25 derungen nach 24 Stunden zurück, bis die Zellen  
wieder ihr ursprüngliches Erscheinungsbild zeigten.

Anhand dieser Tests zeigte sich, dass Angiotropin  
eine reversible Veränderung der Zellmorphologie und  
damit des Phänotyps von Endothelzellen bewirkte.  
30 Von Bedeutung ist fernerhin, dass Angiotropin keine  
mitogene Wirkung auf Endothelzell-Kulturen ausübte  
und daher nur eine Differenzierung, jedoch keine

Proliferation der Endothelzellen induzierte (Höckel et al. 1986, Höckel et al. 1987, Höckel 1988).

Ferner wurde gezeigt, dass Angiotropin die Migration von Endothelzellen stimulierte, nicht jedoch die Migration von 3T3-Fibroblasten (Höckel et al. 1987, Höckel 1988). Das heißt, dass Angiotropin eine spezifische Wirkung auf Endothelzellen ausübt. Des weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Angiotropin eine Nuclease-Aktivität aufweist und bei in vitro-Translations-Assays die Translation inhibieren kann (Seibt 1998, Noll 1998).

Bei Angiotropin handelt es sich um einen metallhaltigen Ribonucleotidpolypeptid (RNP)-Komplex, der extrazellulär isoliert werden konnte. Als Metallionen konnten Kupfer-, Calcium-, Natrium- und Kaliumionen nachgewiesen werden (Wissler et al., 1986). Das Kupferion liegt darin vermutlich in zweiwertiger Form vor (Kuhn et al., 1996, Kuhn 1998). Die Sequenzierung des Protein-Bestandteils ARP (Angiotropin related protein) ergab, dass dieser zu 100% homolog zu Calgranulin C ist (Kuhn 1998). Das Protein gehört zur Familie der S100-Proteine und wurde bereits ohne RNA-Komponente aus Schweine-Granulocyten isoliert, in denen es 8% des gesamten cytosolischen Proteins bildet (Dell'Angelica et al., 1994). Es handelt sich um ein Protein mit 91 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 10614 Dalton. Wie andere S100-Proteine besitzt auch Calgranulin C zwei als EF-Handstrukturen bekannte Calcium-Bindungsmotive (Kretsinger 1980, Isobe et al. 1981; Moncrief et al. 1990; Klingman & Hilt 1988; Schäfer & Heizmann 1996).

Die DE 196 28 895 A1 beschreibt biologisch aktive metallhaltige, insbesondere Kupfer-, Zink- oder Calcium-haltige Ribonucleopolypeptide (RNPs) als nicht-mitogene Morphogene für Blutgefäße definierter Primärstruktur sowie Verfahren zur Herstellung und Gewinnung dieser RNPs. Insbesondere werden eine  
5 Teilsequenz der porcinen Angiotropin-RNA-Sequenz sowie die Aminosäuresequenz des Proteinbestandteils beschrieben.

10 Die DE 198 10 998 C1 beschreibt Sequenzen des RNA-Bestandteils (ARNA) von porcinem Angiotropin, insbesondere die Sequenzen ARNA II, ARNA III, ARNA IV und ARNA V.

Die DE 198 11 047 C1 beschreibt weitere mit porcinem Angiotropin assoziierte RNA-Sequenzen, insbesondere die ARNA I-Sequenz und die ARNA VI-Sequenz.  
15

Die im Stand der Technik bekannten Dokumente offenbaren ausschließlich RNA-Sequenzen, die mit Angiotropin vom Schwein assoziiert sind. Angesichts der  
20 experimentell nachgewiesenen Bedeutung von Angiotropin für die Angiogenese im Säugerorganismus, insbesondere hinsichtlich der Verwendung dieses Morphogens zur gezielten Modulation pathogener angiogenetischer Prozesse beim Menschen, beispielsweise zur Behandlung humaner Krankheiten, ist es  
25 jedoch wünschenswert, die RNA-Sequenzen von humanem Angiotropin zu isolieren und zu charakterisieren. Darüber hinaus geben die im Stand der Technik bekannten Druckschriften keinerlei Einblicke in die  
30 molekularen Mechanismen, die der angiogenetischen Aktivität von Angiotropin zugrunde liegen. Insbe-

- 7 -

sondere ist nicht bekannt, welche Funktion speziell der RNA-Bestandteil besitzt. Gerade im Hinblick auf eine humanmedizinische Anwendung von Angiotropin ist es jedoch wünschenswert, diese molekularen Mechanismen genau zu verstehen, um die angiogenetische Aktivität von Angiotropin gezielt modulieren zu können, das heißt je nach Bedarf zu induzieren beziehungsweise zu verstärken oder aber zu inhibieren.

- 10 Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht also darin, Verfahren und Mittel zur Isolierung und Charakterisierung von RNA-Sequenzen für humanes Angiotropin sowie auf diesen Verfahren und Mitteln basierende weitere  
15 Verfahren und Mittel bereitzustellen, mit deren Hilfe insbesondere im menschlichen Körper physiologisch erwünschte Angiogenese-Prozesse, beispielsweise bei der Wundheilung, gezielt induziert oder verstärkt werden können oder aber pathologische Angiogenese-Prozesse, beispielsweise bei der diabetischen Retinopathie oder bei der Tumorbildung, gezielt inhibiert werden können.

Die vorliegende Erfindung löst dieses Problem durch die Bereitstellung der Lehre gemäß des Hauptanspruchs, insbesondere durch ein Nucleinsäuremolekül, das als funktionaler Bestandteil eines biologisch aktiven Metallo-Ribonucleoprotein-Komplexes geeignet ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- 30 a) einem Nucleinsäuremolekül, das erhältlich ist mittels reverser Transkription von Plazenta-



- 8 -

Gesamt-RNA mit ARNA I-spezifischen Primern insbesondere mit den in SEQ ID Nr. 6 und/oder 7 dargestellten Primern, und einem Fragment davon;

- 5 b) einem Nucleinsäuremolekül, das mindestens eine der in SEQ ID Nr. 1 bis 5 und 8 bis 15 dargestellte Nucleotidsequenz umfasst und einem Fragment davon;
- 10 c) einem Nucleinsäuremolekül, das erhältlich ist durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen eines Nucleinsäuremoleküls nach a) bis b);
- d) einem Nucleinsäuremolekül, das mit einem Nucleinsäuremolekül nach a) bis c) und einem Fragment davon hybridisiert, und
- 15 e) einem Nucleinsäuremolekül, das zu einem Nucleinsäuremolekül nach a) bis b) komplementär ist, und einem Fragment davon.

Die Erfindung löst dieses Problem auch durch die Bereitstellung von diese Nucleinsäuremoleküle ent-

20 haltenen Nucleinsäurekomplexen, die das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül zusammen mit mindestens einem Metallion, das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül zusammen mit mindestens einem Metallion und mindestens einem Protein (hier auch als metallhaltige Ribonucleotidpolypeptide bezeichnet) oder das

25 erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül zusammen mit einem Protein enthalten (hier auch als Ribonucleotidpolypeptide bezeichnet). Derartige Nucleinsäurekomplexe, insbesondere metallhaltige Ribonucleotid-

30 polypeptide, sind für eine Vielzahl von diagnosti-

schen und therapeutischen Anwendungen in hervorragender Weise geeignet.

Erfindungsgemäß wurde das technische Problem in bevorzugter Ausführungsform gelöst, indem die mit humanem Angiotropin assoziierte humane RNA-Sequenz ARNA I mit Hilfe des RT-PCR-Verfahrens unter Verwendung der porcinen Primer ARNA I (forward) und ARNA I (reverse) aus der Gesamt-RNA von humaner Plazenta, einem angiogenetisch äußerst aktivem Gewebe, isoliert wurde. Diese humane ARNA-I-Sequenz enthält neben einem Sequenzabschnitt, der hinsichtlich seiner Länge und seiner Sequenz identisch mit der porcinen ARNA I-Sequenz ist, einen 42 Nucleotide umfassenden Sequenzabschnitt, der in der porcinen ARNA I-Sequenz nicht nachgewiesen wurde. Mit Hilfe des MFOLD-Programms wurde ein Computermodell der Sekundärstruktur der humanen ARNA I-Sequenz erstellt und mit der Sekundärstruktur aller bekannten ARNA-Sequenzen einschließlich der porcinen ARNA-Sequenzen verglichen. Anhand dieses Vergleichs wurde gezeigt, dass alle ARNA-Sequenzen die gemeinsame Konsensus-Sequenz 5'-CUG-3' aufweisen, die jeweils nur in einer Sequenzorientierung auftritt und sich immer im Bereich einer Haarnadelschleife befindet. Diese bei allen bekannten ARNA-Sequenzen gefundene Haarnadelschleife stellt, ohne durch die Theorie gebunden zu sein, möglicherweise die Bindungsdomäne dieser ARNA-Sequenzen an ARP oder Calgranulin C dar, was darauf hinweist, dass dieses Protein ein zelluläres Transportmolekül für verschiedene, mit dem Angiotropin-Komplex assoziierte RNA-Moleküle ist. Diese anhand der computersimulierten Sekundärstruktur nachgewiesene Haarnadelschleife mit der

- 10 -

Konsensussequenz 5'-CUG-3', insbesondere der Sequenz gemäß der SEQ ID Nr. 12 und/oder 13, bietet erfindungsgemäß einerseits die Möglichkeit, den Angiotropin-Proteinbestandteil ARP auch als Transportmolekül für andere RNA-Sequenzen zu verwenden, die natürlicherweise nicht mit dem Angiotropin-Komplex assoziiert sind. Um beispielsweise RNA-Sequenzen mit ribozymatischer Aktivität in Zielzellen des Angiotropin-Komplexes, zum Beispiel Endothelzellen, einzuführen, werden diese RNA-Sequenzen unter Verwendung bekannter Verfahren der Gentechnik mit den Sequenzen, die bei den ARNA-Sequenzen diese Haarnadelschleife bilden, versehen und dann werden unter Verwendung dieser RNA-Sequenzen, des ARP-Bestandteils und von Metall-Ionen in vitro ternäre Komplexe gebildet, die in die zu behandelnden Zellen eingeführt werden. Andererseits bietet die nachgewiesene Haarnadelschleife der ARNA-Sequenzen erfindungsgemäß die Möglichkeit, unter Verwendung der sie enthaltenden erfindungsgemäßen Nucleinsäuren weitere Proteine, beispielsweise andere S100-Proteine, zu isolieren, die ähnlich wie ARP an solche Haarnadel-Strukturen binden können und als potentielle Transportmoleküle für ARNA-Sequenzen beziehungsweise für erfindungsgemäß modifizierte Nucleinsäuren, die natürlicherweise nicht mit dem Angiotropin-Komplex assoziiert sind, verwendet werden können.

Unter Verwendung von in vitro synthetisierten ARNA I-Sequenzen,  $\text{CuCl}_2$  und des Proteinbestandteils ARP wurden in bevorzugter Ausführungsform erfindungsgemäß ternäre Angiotropin-Komplexe, also metallhaltige Ribonucleotidproteine in vitro rekonstituiert

und mit Hilfe des Corioallantois-Membran (CAM)-Tests am bebrüteten Hühnerei hinsichtlich ihrer angiogenetischen Aktivität in vivo getestet. Dabei zeigte sich, dass die rekonstituierten ternären Angiotropin-Komplexe beziehungsweise die in vitro synthetisierten ARNA I (Sense- beziehungsweise Antisense)-Sequenzen über einen weiten Konzentrationsbereich hinweg auf die untersuchten Hühnerembryonen toxisch wirkten. Innerhalb des nicht-lethalen Konzentrationsbereichs zeigten die Ergebnisse der CAM-Assays insgesamt einen RNA-abhängigen Regulationsmechanismus der Angiotropin-induzierten Angiogenese. Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise festgestellt, dass nicht nur der rekonstituierte ternäre Angiotropin-Komplex aus ARNA I (Sense oder Sinn)-RNA (ARNA I(s)), Kupfer(II)-Ionen und nativem porcinen Calgranulin C angiogenetische Aktivität zeigte, sondern auch die nur mit Kupfer(II)-Ionen kombinierte ARNA I(s)-Sequenz. Das heißt, für die angiogenetische Aktivität des Angiotropin-Komplexes ist der Proteinbestandteil Calgranulin C nicht erforderlich. Ebenso überraschend wurde festgestellt, dass mit der ARNA I (Antisense oder Antisinn)-Sequenz (ARNA I(as)) rekonstituierte ternäre Komplexe nicht nur keine angiogenetische Wirksamkeit zeigten, sondern im Testsystem sogar angiogenetische Prozesse hemmen konnten. Erfindungsgemäß ist daher in einer bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, die humane ARNA I(s)-Sequenz als Wirkstoff für ein Therapeutikum zur Induzierung der Angiogenese, beispielsweise im Rahmen der Wundheilung, zu verwenden, während in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform die humane ARNA I(as)-Sequenz als Wirkstoff für ein Therapeutikum zur Hemmung patho-

gener angiogenetischer Prozesse, insbesondere von Tumorangiogenese, eingesetzt werden kann. In beiden vorgenannten Ausführungsformen kann die erfindungsgemäße ARNA I(s) oder (as)-Sequenz zusammen mit Metallionen und/oder Proteinen, zum Beispiel Calgranulin C, beziehungsweise dessen Bestandteilen, eingesetzt werden.

Erfindungsgemäß wird erstmals eine mit humanem Angiotropin assoziierbare Nucleinsäure bereitgestellt, bei der es sich um die humane ARNA I-Sequenz handelt. Die humane ARNA I-Sequenz wurde erfindungsgemäß aus einer humanen Plazenta-Gesamt-RNA mittels des RT-PCR-Verfahrens unter Verwendung der für die porcine ARNA I-Sequenz spezifischen Primer ARNA I (forward) (SEQ ID Nr. 6) und ARNA I (reverse) (SEQ ID Nr. 7) isoliert und cloniert. Dabei wurde neben der humanen ARNA I-Sequenz (SEQ ID Nr. 3 beziehungsweise 4) eine zweite, als humane Pseudo-ARNA-I-Sequenz (SEQ ID Nr. 5) bezeichnete Sequenz isoliert und cloniert.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter ARNA-Sequenzen Nucleinsäuren, insbesondere RNAs, verstanden, die extrazellulär isoliert werden können und in nativer Form unter geeigneten Bedingungen zusammen mit einem Protein, insbesondere ARP (Angiotropin related protein) oder Calgranulin C oder ähnlichen Proteinen, und Metall-Ionen, insbesondere Kupfer-, Calcium-, Natrium- oder Kalium-Ionen, einen ternären Komplex, insbesondere einen Angiotropin-Komplex, bilden, der angiogenetische Aktivität besitzt. Unter einer ARNA I-Sequenz wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung

- 13 -

eine Nucleinsäure, insbesondere eine RNA, verstanden, die bei Verfahren zur Aufreinigung von Angiotropin, beispielsweise unter Verwendung von Lektin-induzierten Schweine-Leukocyten als Ausgangsmaterial, nach verschiedenen Reinigungsschritten als  
5 einzige der bekannten ARNA-Sequenzen in der nach dem letzten Reinigungsschritt erhaltenen Fraktion, die noch angiogenetische Aktivität aufweist, spezifisch angereichert vorliegt und von der deshalb angenommen wird, das sie die RNA-Form ist, die in den  
10 Angiotropin-Komplex eingebaut wird.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „angiogenetische Aktivität“, dass eine Substanz die Fähigkeit aufweist, die Aus-  
15 bildung neuer Blutgefäße durch das Aussprossen von Kapillaren aus einem bereits bestehenden Gefäßsystem zu induzieren oder zu verstärken.

Bei der Sequenzierung der humanen ARNA I-Sequenz wurde erfindungsgemäß festgestellt, dass sie einen  
20 Sequenzabschnitt enthält, der bezüglich seiner Länge und seiner Sequenz vollkommen identisch mit der aus Lektin-stimulierten Schweine-Leukocyten isolierten porcinen ARNA I-Sequenz ist. Die humane ARNA I-Sequenz enthält darüber hinaus einen humanspezifischen 42 Nucleotide umfassenden Abschnitt,  
25 der in der porcinen Sequenz nicht nachgewiesen wurde und in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist. Die ersten 19 Nucleotide dieser 42 Nucleotide weisen besondere Humanspezifität auf und sind in beiden Orientierungen in SEQ ID Nr. 14 und 15 dargestellt. Da die  
30 identifizierte humane ARNA I-Sequenz am 3'-Ende keinen Poly(A)-Tail enthielt, konnte nicht ermit-

- 14 -

- telt werden, in welcher Orientierung die native Sequenz intra- oder extrazellulär vorliegt. Die nachstehend beschriebenen Sinn- beziehungsweise Antisinn-Orientierungen der humanen ARNA I-Sequenz wurden daher willkürlich festgelegt. SEQ ID Nr. 2 zeigt die Sequenz von SEQ ID Nr. 1 in Antisinn-Orientierung. Die vollständige Nucleotidsequenz des humanen ARNA I-Moleküls in Sinn-Orientierung ist in SEQ ID Nr. 3 dargestellt, während SEQ ID Nr. 4 die vollständige Sequenz in Antisinn-Orientierung zeigt. Der 42 Nucleotide in Sinn-Orientierung umfassende Bereich (SEQ ID Nr. 1) befindet sich am 3'-Bereich der humanen ARNA-I-Sequenz (SEQ ID Nr. 3, Position 164 bis 205).
- 15 Eine Analyse der humanen ARNA I-Sequenz ergab, dass sie ausschließlich mit dem porcinen ARNA I (forward)-Primer amplifiziert wurde, was sich am besten dadurch erklären lässt, dass es sich bei der ursprünglich amplifizierten Nucleinsäuresequenz um ein circuläres Molekül handelt. Einen weiteren Hinweis darauf, dass es sich bei der ursprünglich amplifizierten Nucleinsäure um ein circuläres Molekül handelt, liefert die erfindungsgemäß identifizierte humane ARNA I-Nucleotidsequenz selbst. Die Sequenz ihres 5'-Endes und die Sequenz ihres 3'-Endes sind komplementär zueinander, dass heißt, die Sequenzen des 5'-Endes und des 3'-Endes können sich unter geeigneten Bedingungen aneinanderlagern und somit zu einer Circularisierung des Moleküls führen. Es ist bekannt, dass bei der Prozessierung von prä-mRNAs circuläre RNAs erhalten werden können (Padgett et al. 1984; Reed und Maniatis 1985). Dabei werden die darin enthaltenen Introns in Form

- 15 -

von Lariat-Strukturen gespleißt. Die isolierte humane ARNA I-Sequenz stellt daher mit großer Wahrscheinlichkeit die Intronsequenz einer längeren prä-mRNA dar.

Unterstützt wird diese Vermutung durch die zweite  
5 isolierte Nucleinsäuresequenz, die humane Pseudo-  
ARNA I-Sequenz. Wie Untersuchungen von Sequenzüber-  
einstimmungen zeigten, besteht diese erfindungsge-  
mäßige Nucleinsäure, bei der es sich vermutlich um  
eine prä-mRNA oder ein Teilstück einer größeren  
10 prä-mRNA handelt, aus zwei unterschiedlichen Ab-  
schnitten und ist in SEQ ID Nr. 5 sowie schematisch  
in Figur 3 dargestellt. Bei diesen beiden Abschnit-  
te der Pseudo-ARNA I-Sequenz handelt es sich wahr-  
scheinlich um Intron- (ARNA I(as)) und Exon-(L27a  
15 Exon II)Sequenzen. Der 5' gelegene Abschnitt der  
Pseudo-ARNA I-Sequenz (SEQ ID Nr. 5) umfasst die  
ersten 63 Nucleotide (SEQ ID Nr. 11) des 5'-Endes  
der humanen ARNA I ( Antisinn)-Sequenz (SEQ ID Nr.  
4), denen sich die Sequenz des zweiten Exons der  
20 mRNA des humanen ribosomalen L27a-Proteins und ein  
Poly(A)-Tail am 3'-Ende anschließen. Die ersten  
(das heißt 5' gelegenen) 23 Nucleotide der genann-  
ten 63 Nucleotide entsprechen den ersten 23 Nucleo-  
tiden der porcinen ARNA I(s) Sequenz. Dies ist auf  
25 die Selbstkomplementarität des 5'- und 3'-Endes der  
humanen ARNA I(as) zurückzuführen. Gleiches gilt  
für die ARNA I(s). Die Nucleotide 43 bis 49 (je-  
weils einschließlich) sind Bestandteile der Intron-  
sequenz der Pseudo-ARNA-I-Sequenz. Dabei stellen  
30 die 19 Nucleotide 24 bis 42 (jeweils einschließ-  
lich) der genannten 63 Nucleotide der humanen ARNA  
I (as)-Sequenz die human-spezifische Antisinn-  
Nucleotidsequenz in SEQ ID Nr. 2 dar. Überraschen-



- 16 -

derweise sind die letzten (das heißt 3' gelegenen Positionen 50 bis 63 in SEQ ID Nr. 4 oder 11) 14 Nucleotide (also: 5'-GCU AAC AAA GUU UU-3') des 63 Nucleotide langen ARNA I(as)-Sequenzabschnittes (SEQ ID Nr. 11) innerhalb der humanen Pseudo-ARNA I-Sequenz homolog zu einem Teilabschnitt des zweiten Exons der prä-mRNA des humanen ribosomalen L27a-Proteins. Dieser 14 Nucleotide umfassende Abschnitt der ARNA I(as)-Sequenz könnte daher Bestandteil der 3'-Spleiß-Stelle dieser prä-mRNA sein.

Ein weiterer, in SEQ ID Nr. 5 nicht dargestellter, Abschnitt der Pseudo-ARNA I-Sequenz umfasst die in Figur 3 dargestellten 5'-wärts von der 63 Nucleotide umfassenden Sequenz gelegene ARNA(as)-Sequenz mit den Nucleotiden 64 bis 205 und die wiederum 5' davon gelegene L27a Exon I-Sequenz.

Von ribosomalen Proteinen ist allgemein bekannt, dass diese entwicklungsbiologisch zu den ältesten Proteinen gehören und dass die ihnen zu Grunde liegenden Gene hochkonserviert sind. Vom humanen ribosomalen L27a-Protein ist außerdem bekannt, dass die mRNA dieses Proteins in Karzinomzellen gegenüber der mRNA anderer ribosomaler Proteine stark überexprimiert wird, so dass zu vermuten ist, dass dieses Protein an einer verstärkten Zellproliferation beteiligt ist (Frigerio et al. 1995). Obwohl dem der Pseudo-ARNA I-Sequenz zu Grunde liegenden Gen zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine eindeutige Funktion zugeordnet werden kann, kann man davon ausgehen, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Pseudogen des ribosomalen L27a-Gens

- 17 -

handelt. Pseudogene sind insbesondere bei Genfamilien anzutreffen, deren Produkte häufig benötigt werden. Bei der humanen Pseudo-ARNA I-Sequenz ist weiterhin bemerkenswert, dass die darin enthaltende  
5 Teilsequenz der ARNA I-Sequenz als mutmaßliche Intron-Sequenz offensichtlich spezies-übergreifend konserviert ist, da dieser Sequenzbereich ebenfalls in der porcinen ARNA I-Sequenz enthalten ist. Durch die Pseudo-ARNA I-Sequenz wird die Vermutung untermauert, dass die ARNA I-Sequenz die Intronsequenz  
10 einer längeren prä-mRNA ist und daraus in zirkulärer Form gespleißt wird. Die potentielle Generierung einer zirkulären ARNA I(s) ist in Figur 3 dargestellt.

15 Erfindungsgemäß wird also eine, vorzugsweise isolierte und vollständig gereinigte, Nucleinsäure bereitgestellt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

a) einer Nucleinsäure, die erhältlich ist mittels  
20 reverser Transkription von Plazenta-Gesamt-RNA mit ARNA I-spezifischen Primern insbesondere mit den in SEQ ID Nr. 6 und/oder Nr. 7 dargestellten Nucleotidsequenzen, oder einem Fragment davon;

b) einer Nucleinsäure, die mindestens eine in SEQ  
25 ID Nr. 1, 3, 5, 8, 10, 12 oder/und 14 dargestellte Nucleotidsequenz umfasst;

c) einer Nucleinsäure, die zu einer Nucleinsäure nach a) bis b) komplementär ist, insbesondere einer Nucleinsäure mit mindestens einer der in  
30 SEQ ID Nr. 2, 4, 9, 11, 13 oder/und 15 darge-

- 18 -

stellten Nucleotidsequenz, oder einem Fragment davon;

- d) einer Nucleinsäure, die erhältlich ist durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen einer Nucleinsäure nach a) bis c); und
- e) einer Nucleinsäure, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes mit einer Nucleinsäure nach a) bis d) oder einem Fragment davon hybridisiert.

Die Nucleinsäure kann sowohl einzelsträngig als auch doppelsträngig vorliegen.

Die Nucleinsäure kann eine DNA-Sequenz, zum Beispiel Teil einer genomischen DNA-Sequenz oder eine cDNA-Sequenz, oder eine RNA-Sequenz, zum Beispiel eine mRNA-Sequenz oder ein Teil davon, sein. Im Falle einer DNA-Sequenz sind bei dargestellten RNA-Sequenzen die mit U gekennzeichneten Uracilbasen durch T, also Thyminbasen, auszutauschen und umgekehrt. Die Nucleinsäure kann Teil eines längeren nativen Nucleinsäuremoleküls sein. Die Nucleinsäure kann sowohl als circuläres als auch als lineares Nucleinsäuremolekül vorliegen. Die Nucleinsäuren, dargestellt in den SEQ ID Nr. 1 bis 15, werden von der Erfindung in beiden Orientierungen 5' zu 3' und 3' zu 5' sowie als Sinn- und Antisinn-Strang erfasst. Die Nucleinsäure kann sowohl natürlichen Ursprungs sein, das heißt, sie kann sowohl extra- als auch intrazellulär aus Zellen, Geweben oder Organen eines Säugerorganismus isoliert werden, als auch

- 19 -

synthetischen Ursprungs sein. Außerdem kann die Nucleinsäure sowohl mit Metall-Ionen, insbesondere Kupfer-, Natrium-, Kalium- oder Calcium-Ionen, als auch mit Proteinen, wie Calgranulin C oder ARP, assoziiert vorliegen.

Die Erfindung umfasst auch modifizierte Nucleinsäuren, die beispielsweise durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure erhältlich sind, das heißt also auch Nucleinsäuren, die als Mutanten, Derivate oder funktionellen Äquivalente einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure bezeichnet werden können. Die Sequenz der Nucleinsäuren kann beispielsweise gezielt modifiziert werden, um innerhalb der Nucleinsäuresequenz geeignete Restriktions-Schnittstellen bereitzustellen oder nicht erforderliche Nucleinsäuresequenzen oder Restriktions-Schnittstellen zu entfernen. Dabei werden die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren in Plasmiden inseriert und mittels Standardverfahren der Mikrobiologie/Molekularbiologie einer Mutagenese oder einer Sequenzveränderung durch Rekombination unterzogen. Zur Erzeugung von Insertionen, Deletionen oder Substitutionen, wie Transitionen und Transversionen, sind beispielsweise Verfahren zur in vitro-Mutagenese, "primer repair"-Verfahren sowie Restriktions- und/oder Ligationsverfahren geeignet (vgl. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA). Sequenzveränderungen lassen sich auch durch Anlagerung natürlicher oder synthetischer Nucleinsäuresequenzen erreichen. Beispiele für synthetische Nucleinsäure-

- 20 -

sequenzen sind Adaptoren oder Linker, die u.a. auch zur Verknüpfung von Nucleinsäure-Fragmenten an diese Fragmente angefügt werden.

- Die vorliegende Erfindung umfasst auch Nucleinsäuren, die mit einer der vorstehend beschriebenen Nucleinsäuren nach a) bis d) hybridisieren. Der im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendete Ausdruck "Nucleinsäure, die mit einer Nucleinsäure nach a) bis d) hybridisiert" bedeutet eine Nucleinsäure, die unter mäßig stringenten Bedingungen mit einer Nucleinsäure nach a) bis d) hybridisiert. Beispielsweise kann die Hybridisierung mit einer radioaktiven Gensonde in einer Hybridisierungslösung (25% Formamid; 5 x SSPE; 0,1% SDS; 5 x Denhardt-Lösung; 50 µg/ml Heringsperma-DNA; bezüglich Zusammensetzung der Einzelkomponenten vgl. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) 20 Stunden bei 37°C erfolgen. Anschließend wird unspezifisch gebundene Sonde durch mehrfaches Waschen der Filter in 2 x SSC/0,1% SDS bei 42°C entfernt. Vorzugsweise werden die Filter mit 0,5 x SSC/0,1% SDS, besonders bevorzugt mit 0,1 x SSC/0,1% SDS bei 42°C gewaschen.
- Zur Charakterisierung der erfindungsgemäß identifizierten humanen ARNA I-Sequenz wurde von dieser Nucleinsäure unter Verwendung des MFOLD-Programms ein Modell der Sekundärstruktur modelliert. Das MFOLD-Programm, Version 2 (Zuker 1989; Jaeger et al. 1989; Jaeger et al. 1990) liefert Aussagen über die Strukturen von Nucleinsäuren mit der geringsten freien Enthalpie. Ebenso wurden von allen bekannten

ARNA-Sequenzen einschließlich der bekannten porci-  
nen ARNA-Sequenzen Modelle der Sekundärstrukturen  
erstellt, um mögliche Strukturhomologien zwischen  
diesen Nucleinsäuren zu bestimmen und somit wesent-  
5 liche funktionelle Bereiche der Nucleinsäuren zu  
charakterisieren.

Die erfindungsgemäß vorgenommene Computer-  
Modellierung der in Figur 1 dargestellten Sekundär-  
struktur der humanen ARNA I(s)-Sequenz zeigte, dass  
10 diese Nucleinsäure aufgrund ihrer Vielzahl von se-  
quenzkomplementären Bereichen eine hochsymmetri-  
sche, über weite Sequenzabschnitte hinweg dop-  
pelsträngige Sekundärstruktur bildet, die insbeson-  
dere durch zwei Kleeblattstrukturen gekennzeichnet  
15 ist. Wie aus Figur 1 ersichtlich, unterscheidet  
sich die zweite Kleeblattstruktur von der ersten  
dadurch, dass sie das offene 5'-3'-Ende des Nuc-  
leinsäuremoleküls enthält. Aus der Figur 1 ist e-  
benfalls ersichtlich, dass, wie vorstehend be-  
20 schrieben, die Sequenz des 3'-Endes der humanen AR-  
NA I-Sequenz komplementär zur Sequenz des 5'-Endes  
ist. Diese Sequenzkomplementarität ermöglichte auch  
die Amplifikation der humanen ARNA I-Sequenz mit  
nur einem Primer.

25 Ein Vergleich der erstellten Sekundärstruktur mit  
denen anderer bekannter ARNA-Sequenzen zeigte, dass  
alle ARNA-Sequenzen die gemeinsame Konsensus-  
Sequenz 5'-CUG-3', insbesondere die in SEQ ID Nr.  
12 und 13 gezeigten Sequenzen aufweisen, die je-  
30 weils nur in einer Sequenzorientierung auftritt und  
sich immer im Bereich einer Haarnadelschleife be-  
findet. Diese bei allen Sekundärstrukturmodellen

- 22 -

der bekannten ARNA-Sequenzen gefundene Haarnadel-  
schleife stellt vermutlich die Bindungsdomäne die-  
ser ARNA-Sequenzen an ARP oder Calgranulin C oder  
ein ähnliches Protein dar. Die in der Haarnadel-  
5 schleife enthaltene Konsensus-Sequenz 5'-CUG-3' be-  
findet sich in einem Sequenzabschnitt, der Homolo-  
gien zur Sequenz des Hammerhead-Ribozyms aufweist.  
Das Hammerhead-Ribozym ist Bestandteil sich selbst-  
spleißender, circulärer, viraler RNA-Moleküle, die  
10 sich entweder allein oder in Abhängigkeit von Hel-  
fer-Viren replizieren (Haseloff und Gerlach 1988).  
Die konservierte Konsensus-Sequenz 5'-  
CUGANGA(N)<sub>x</sub>GAAAC des Hammerhead-Ribozyms ist teil-  
weise auch in der humanen ARNA I-Sequenz (Sinnori-  
15 entierung) (5'-CUG GAU UGA AAA G -3', SEQ ID Nr. 8)  
enthalten. Das deutet darauf hin, dass das ARNA I-  
Molekül, wie auch die anderen ARNA-Moleküle, in  
diesem Sequenzabschnitt neben der Proteinbindungs-  
domäne einen weiteren funktionellen Bereich ent-  
20 hält, der ribozymatische Aktivität besitzt.

Die Erfindung betrifft daher auch eine Nucleinsäu-  
re, die in ihrer Sekundärstruktur eine Haarnadel-  
schleife mit der Konsensus-Sequenz 5'-CUG-3', ins-  
besondere mit einer der in SEQ ID Nr. 12 und 13 ge-  
25 zeigten Sequenzen ausbildet. Die Erfindung betrifft  
ferner eine Nucleinsäure, deren in der Sekundär-  
struktur ausgebildete Haarnadelschleife mit einer  
der in SEQ ID Nr. 12 und 13 gezeigten Sequenzen die  
Bindung der Nucleinsäure an ein Protein, insbeson-  
30 dere ein Angiotropin related protein-Molekül ver-  
mittelt.

- 23 -

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine erstmalig nachgewiesene Bindungsdomäne von Nucleinsäuren, insbesondere ARNA-Nucleinsäuren, zur Bindung an Proteine, insbesondere ARP oder Calgranulin C oder ähnliche Proteine, die gekennzeichnet ist durch die Ausbildung einer charakteristischen Haarnadelschleife mit der jeweils nur in einer Sequenzorientierung auftretenden Konsensus-Sequenz 5'-CUG-3', insbesondere einer Sequenz ausgewählt aus SEQ ID Nr. 12 oder 13, wobei letztere gegebenenfalls eine höhere Spezifität zur Proteinbindungsdomäne ARP beziehungsweise Cal C aufweisen.

Die Tatsache, dass die vorstehend beschriebene Haarnadelschleife der ARNA-Sequenzen, also die vermutliche Bindungsdomäne an ARP oder Calgranulin C oder ein ähnliches Protein, in der Sekundärstruktur unterschiedlicher ARNA-Sequenzen vorhanden ist, weist darauf hin, dass ARP oder Calgranulin C oder ähnliche Proteine Moleküle für den inter- und/oder intrazellulären Transport der verschiedenen, mit dem Angiotropin-Komplex assoziierten RNA-Bestandteile sind. Dies bietet erfindungsgemäß die Möglichkeit, den Angiotropin-Proteinbestandteil ARP oder ähnliche Proteine, insbesondere andere S100-Proteine, auch für RNA-Moleküle, die natürlicherweise nicht mit dem Angiotropin-Komplex assoziiert sind, als Transportmoleküle zu nutzen.

Erfindungsgemäß können RNA-Moleküle mit enzymatischer Aktivität, wie zum Beispiel Ribozyme, oder Nucleinsäuren, beispielsweise RNA-Moleküle, die die Transkriptionsprodukte von Genen von potentiell therapeutischem oder diagnostischem Interesse dar-



- 24 -

stellen, mit den erfindungsgemäßen ARNA-spezifischen Sequenzen versehen werden, die unter geeigneten Bedingungen zur Ausbildung einer Haarnadelschleife zur Bindung an ARP oder Calgranulin C oder ähnliche Proteine, insbesondere andere S100-Proteine, führen, die der bei ARNA-Sequenzen nachgewiesenen entspricht. Vorzugsweise werden solche Nucleinsäuren, die eine ARNA-spezifische Haarnadelstruktur zur Bindung an ARP oder ähnliche Transportproteine aufweisen, unter Verwendung herkömmlicher synthetischer oder gentechnischer Verfahren (vgl. Sambrook et al. 1989) hergestellt. Soll die zu transferierende Nucleinsäure ribozymatische Aktivität aufweisen, kann die angelagerte Haarnadelschleifen-Sequenz gegebenenfalls so modifiziert werden, dass sie eine stärkere Homologie zur Konsensus-Sequenz von Hammerhead-Ribozymen als die erfindungsgemäße Haarnadelschleife der humanen ARNA I-Sequenz aufweist. Soll die zu transferierende Nucleinsäure keine ribozymatische Aktivität aufweisen, kann die Sequenz zur Ausbildung einer Haarnadelschleife so modifiziert werden, dass die für die Ribozym-Aktivität relevanten Nucleotide gegen Nucleotide ausgetauscht werden, die zu einer Blockierung der Ribozym-Aktivität führen. Solche Sequenzmodifikationen können mit Hilfe üblicher gentechnischer Verfahren, beispielsweise Verfahren der in vitro-Mutagenese, erfolgen.

Nach Bildung eines ternären Komplexes mit ARP und Metall-Ionen, beispielsweise Kupfer-Ionen, können die so hergestellten beziehungsweise modifizierten Nucleinsäuren gezielt in solche Zellen und/oder Gewebe eingeschleust werden, die natürliche Zielzel-

- 25 -

len oder Zielgewebe für Angiotropin darstellen, zum Beispiel Endothelzellen. Sollen die so hergestellten beziehungsweise modifizierten Nucleinsäuren spezifisch in andere Zielzellen eingeführt werden, werden zur Bildung ternärer Komplexe andere Proteine, beispielsweise andere S100-Proteine, verwendet, die gegebenenfalls andere Zielzell-Spezifitäten aufweisen. Erfindungsgemäß können für die Assoziation der Nucleinsäure mit dem Protein solche Proteine verwendet werden, die eine Bindung an die Nucleinsäure ermöglichen. Dies können Proteine sein, die dieselbe Bindungsdomäne an RNAs wie ARP oder Cal C besitzen. Diese Proteine können an eine RNA binden, die innerhalb einer Haarnadelschleife entweder die Sequenzabfolge 5'-CUG-3' oder die Sequenzabfolge der SEQ ID Nr. 12 oder der SEQ ID Nr. 13 aufweist. Diese Proteine können noch zusätzliche, das heißt von ARP beziehungsweise Cal C verschiedene Sequenzdomänen aufweisen. Diese weiteren Sequenzdomänen können eine von ARP und Cal C abweichende Zielzellspezifität vermitteln.

Aufgrund dieser gezielt modifizierten Zielzellspezifität kann der gebildete Nucleinsäurekomplex spezifisch an die jeweils gewünschten Zellen andocken, in diese penetrieren und anschließend die gewünschte Aktivität entfalten. Der gebildete Nucleinsäurekomplex kann in vivo oder in vitro in beliebige eukaryontische Zellen, Zellkulturen oder Gewebe, insbesondere jedoch Zellen und Gewebe von Säugern und Vögeln, eingeschleust werden.

Nach Einführung solcher modifizierten Nucleinsäuren können in den Zellen beispielsweise spezifische

Nucleinsäuren oder Gene ausgeschaltet werden, zum Beispiel über eine ribozymatische Aktivität der eingeschleusten Nucleinsäuren, über einen Antisense-Mechanismus oder einen Cosuppressions-Effekt.

5 Es können auch Gene eingeführt werden, die vorher in diesen Zellen nicht vorhanden waren beziehungsweise deren Funktion in diesen Zellen gestört war. So ist zum Beispiel eine gezielte Tumorthherapie möglich, indem Zielzellen durch diese spezifisch

10 erkennende Nucleinsäurekomplexe erkannt und bekämpft werden. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere auch zur somatischen Gentherapie. Ebenso können auch Gene in Zellen eingeführt, die als Reporter-Gene fungieren, beispielsweise um solche Zellen zu markieren oder nachzuweisen.

15

Dem therapeutischen Einsatz von Ribozymen standen in der Vergangenheit prinzipiell zwei Probleme gegenüber. Zum einen sind RNA-Moleküle allgemein sehr

20 Hydrolyse-empfindlich, was zu einer relativ kurzen Halbwertszeit der Moleküle führt. Zum anderen war in der Vergangenheit die Effizienz bei herkömmlichen Verfahren zur Transfektion von RNA-Molekülen sehr gering. Im Stand der Technik sind jedoch mehrere Verfahren beschrieben, mit deren Hilfe die ge-

25 nannten Probleme überwunden werden können. Beispielsweise kann durch eine chemische Modifikation des Ribose-Phosphat-Gerüsts eine RNA so stabilisiert werden, dass sie gegenüber Hydrolyse größere

30 Resistenz zeigt (Perreault et al., 1991; Yang et al. 1992; Heidenreich et al. 1993), wobei insbesondere 2'-OH-Gruppen durch andere funktionelle Gruppen, beispielsweise Amino-, Fluoro-, O-Allyl- oder

- 27 -

O-Methylgruppen substituiert werden. Die Effizienz der Transfektion von RNAs kann beispielsweise dadurch erhöht werden, dass die Transfektion über Liposomen vermittelt wird, insbesondere solche, die kationische Lipide und neutrale Phospholipide umfassen (Felgner et al. 1993). Mit Hilfe solcher Liposomen können RNA-Moleküle intrazellulär eingeschleust werden (Akhtar et al. 1991).

Bevor die erfindungsgemäß modifizierten Nucleinsäuren in Zielzellen eingeführt werden, können sie daher gegebenenfalls chemisch modifiziert werden, indem beispielsweise eine oder mehrere funktionelle 2'-OH-Gruppen des Zucker-Phosphat-Gerüsts gegen andere funktionelle Gruppen, beispielsweise eine Amino-, Fluoro-, O-Allyl- oder O-Methylgruppe ausgetauscht werden, um die Nucleinsäure zu stabilisieren. Die mit Metall-Ionen und/oder Proteinen komplexierten Nucleinsäuren können gegebenenfalls unter Verwendung von Liposomen in Zielzellen eingeführt werden, um die Effizienz des Transports in die gewünschten Zielzellen zu verbessern. Selbstverständlich erfasst die Erfindung auch natürlicherweise in Zellen stattfindende posttranskriptionale Modifikationen.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein Verfahren zum Transport eines Nucleinsäuremoleküls in eukaryontische Zellen, Zellkulturen oder Gewebe, insbesondere Zellen und Gewebe von Säugern und Vögeln, in vitro oder in vivo umfassend die folgenden Schritte:

- 28 -

- Modifikation des zu transportierenden Nucleinsäuremoleküls, das natürlicherweise nicht mit dem Angiotropin-Komplex und/oder ähnlichen Komplexen im Zusammenhang steht, durch Anlagerung von Sequenzen eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls, die unter geeigneten Bedingungen zur Ausbildung einer Haarnadel-schleife mit der Konsensus-Sequenz 5'-CUG-3' geeignet sind;
- Herstellung eines ternären Komplexes durch in vitro Zugabe von Metall-Ionen und mindestens einem Protein zu dem modifizierten Nucleinsäuremolekül;
- Applikation des hergestellten ternären Komplexes auf Zellen oder Gewebe, in die das modifizierte Nucleinsäuremolekül eingebracht werden soll.

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Transport eines Nucleinsäuremoleküls in eine eukaryontische Zelle, wobei das Protein ein ARP-Molekül, Calgranulin C oder ein ähnliches Protein, insbesondere ein das Bindemotiv von ARP oder Calgranulin C für das Nucleinsäuremolekül aufweisendes Protein ist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden zur Herstellung des ternären Komplexes Metallionen wie  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{K}^{+}$ - oder  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen verwendet. In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das modifizierte Nucleinsäuremolekül ein Molekül mit enzymatischer Aktivität.

- 29 -

Erfindungsgemäß ist ferner vorgesehen, die ARNA für diagnostische Zwecke spezifisch zu markieren. Dies kann beispielsweise mit einem radioaktiven Label, mit Digoxigenin oder mit fluoreszierenden Markern  
5 erfolgen. Mittels radioaktiv und Digoxigenin markierter ARNA können beispielsweise in situ Hybridisierungen durchgeführt werden, die eine zelluläre Lokalisation der ARNA nach der zellulären Aufnahme ermöglichen würden. Eine mit fluoreszierenden Substanzen markierte ARNA kann beispielsweise in kul-  
10 tivierten Zellen nach deren zellulärer Aufnahme mikroskopisch sowohl zeitlich als auch räumlich verfolgt werden.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vor-  
15 liegenden Erfindung sieht daher die Verwendung von ARNA-spezifischen Sequenzen, also der erfindungsgemäßen Nucleinsäuren, insbesondere Sequenzen, die unter geeigneten Bedingungen zur Ausbildung einer die Konsensus-Sequenz 5'-CUG-3' enthaltenden Haarnadelstruktur fähig sind, zur Modifikation von na-  
20 türlicherweise nicht mit dem Angiotropin-Komplex assoziierten Nucleinsäuren zur Herstellung von Diagnostika und Therapeutika vor. Die so modifizierten Nucleinsäuren lassen sich als Diagnostika oder  
25 Therapeutika für spezifische Zellen oder Gewebe verwenden, indem sie an ARP oder Calgranulin C oder ähnliche Transportmoleküle gebunden und über diese Transportmoleküle in die zu behandelnden Zielzellen eingeschleust werden.

30 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter Diagnostika beliebige Stoffe verstanden, die spezifisch das Vorhandensein von Zuständen,

- 30 -

Prozessen oder Substanzen beziehungsweise deren Abwesenheit erkennen können und insbesondere Rückschlüsse auf Krankheitszustände geben können. Diagnostika weisen häufig erkennende und markierende Funktionen auf.

Unter dem Begriff Therapeutika werden insbesondere solche Stoffe verstanden, die entweder prophylaktisch oder krankheitsbegleitend eingesetzt werden können, um Krankheitszustände zu vermeiden, zu lindern oder zu beseitigen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter Krankheiten auch Zustände wie unnatürliche Gemütszustände, Schwangerschaften, Alterserscheinungen, Entwicklungsstörungen oder ähnliches verstanden.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sieht daher die Verwendung von ARNA-spezifischen Sequenzen, also der erfindungsgemäßen Nucleinsäuren, insbesondere Sequenzen, die unter geeigneten Bedingungen zur Ausbildung einer die Konsensus-Sequenz 5'-CUG-3', insbesondere eine Sequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 12 oder 13, enthaltenden Haarnadelstruktur fähig sind, zur Isolierung von Proteinen vor, die ähnlich wie ARP an solche Haarnadel-Strukturen binden können. Bei solchen Proteinen kann es sich beispielsweise um andere Vertreter der S100-Proteine handeln, die gegebenenfalls andere Zellspezifitäten aufweisen als ARP.

Erfindungsgemäß wurde die Funktion der erfindungsgemäßen humanen ARNA I-Sequenz in vivo unter Ver-

wendung des Chorioallantois-Membran-Tests am bebrüteten Hühnerei bestimmt. Der Chorioallantois-Membran-Test stellt ein einfaches Testsystem zur Untersuchung von Neovaskularisierungs-Prozessen dar. Eine angiogenetische Wirkung lässt sich anhand der Ausbildung von Blutgefäßen leicht nachweisen. In vitro synthetisierte Angiotropin-RNA wurde mit ARP (Calgranulin C) und  $\text{CuCl}_2$  zu einem ternären Angiotropin-Komplex rekonstituiert und auf die freigelegte Membran appliziert. Dabei zeigte sich, dass die rekonstituierten ternären Angiotropin-Komplexe beziehungsweise die in vitro synthetisierten ARNA I (Sense- beziehungsweise Antisense-)Sequenzen über einen weiten Konzentrationsbereich hinweg auf die Hühnerembryonen toxisch wirkten. Innerhalb des nicht-letalen Konzentrationsbereichs zeigten die Ergebnisse der CAM-Assays insgesamt einen RNA-abhängigen Regulationsmechanismus der Angiotropin-induzierten Angiogenese. Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise festgestellt, dass nicht nur der rekonstituierte ternäre Angiotropin-Komplex aus ARNA I(s)-RNA, Kupfer(II)-Ionen und nativem porcinen Calgranulin C angiogenetische Aktivität zeigte, sondern auch die ARNA I(s)-Sequenz in Kombination mit Kupfer(II)-Ionen, jedoch ohne den Proteinbestandteil Calgranulin C. Ebenso überraschend wurde festgestellt, dass ARNA I (Antisense)-Sequenzen (ARNA I(as)) enthaltende ternäre Komplexe nicht nur keine angiogenetische Wirksamkeit zeigten, sondern im Testsystem sogar die Angiogenese hemmen konnten.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist daher vorgesehen, die erfindungsgemä-



Be ARNA I-Sequenz als Wirkstoff zur Modulation angiogenetischer Prozesse einzusetzen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die ARNA I(s)-Sequenz als Wirkstoff  
5 zur Herstellung eines Therapeutikums zur Induzierung angiogenetische Prozesse, insbesondere zur Wundheilung, verwendet. In einer vorteilhaften Ausgestaltung kann das ARNA I(s)-Molekül in der Transplantationschirurgie eingesetzt werden, um durch  
10 die verstärkte Vaskularisierung die Integration des Transplantats zu beschleunigen und die Bildung ischämischer Nekrosen zu vermeiden. In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung kann das ARNA I(s)-Molekül zur Induzierung der Neovaskularisierung von  
15 Herzkranzgefäßen verwendet werden. Dadurch läßt sich eine Coronarangioplastie unter Verwendung eines Ballonkatheters oder mittels einer Bypass-Operation vermeiden. Erfindungsgemäß kann die ARNA I(s)-Sequenz entweder in Kombination mit Kupfer(II)-Ionen und Calgranulin C oder nur in Kombination mit Kupfer(II)-Ionen, das heißt ohne das Protein Calgranulin C, eingesetzt werden.  
20

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die ARNA I(as)-Sequenz als Wirkstoff  
25 zur Herstellung eines Therapeutikums zur Hemmung pathogener angiogenetischer Prozesse, insbesondere bei Hämangiomen oder bei der Tumorangio-genese, verwendet. Vorzugsweise liegt die ARNA I(as)-Sequenz in Form eines ternären Komplexes, das heißt in Kombination mit Calgranulin C und Kupfer(II)-Ionen,  
30 vor. In bevorzugter Ausführungsform liegt dieser

- 33 -

ternäre Komplex zusammen mit Kalium- und Natriumionen vor.

Erfindungsgemäß können die zur Verwendung als Wirkstoff zur Modulierung angiogenetischer Prozesse vorgesehenen Nucleinsäuren auch chemisch modifiziert werden, indem beispielsweise ein oder mehrere funktionelle 2'-OH-Gruppen des Zucker-Phosphat-Gerüsts gegen andere funktionelle Gruppen, beispielsweise eine Amino-, Fluoro-, O-Allyl- oder O-Methylgruppe ausgetauscht werden, um die Nucleinsäure zu stabilisieren. Gegebenenfalls können die mit Metall-Ionen und/oder Proteinen komplexierten Nucleinsäuren auch unter Verwendung von Liposomen in die Zielzellen eingeführt werden, um die Effizienz der Transfektion zu verbessern.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch ein Verfahren zur Induzierung angiogenetischer Prozesse in Geweben eines Säugerorganismus, umfassend die folgenden Schritte:

- 20 - Herstellung eines ternären Komplexes durch Komplexierung eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls in Sinn-Orientierung mit Metall-Ionen und gegebenenfalls einem Protein in vitro; und
- Applikation der komplexierten Nucleinsäure auf  
25 Gewebe, in denen der angiogenetische Prozess induziert werden soll.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Hemmung angiogenetischer Prozesse in Geweben eines Säugerorganismus, umfassend die folgenden Schritte:

30

- 34 -

- Herstellung eines ternären Komplexes durch Komplexierung eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls in Antisinn-Orientierung mit Metall-Ionen und gegebenenfalls einem Protein in vitro;  
5 und
- Applikation der komplexierten Nucleinsäure auf Gewebe, in denen ein angiogenetischer Prozess gehemmt werden soll.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin sich  
10 aus Figur 2 ergebene Verfahren und Verwendungen, mittels derer die molekularen Funktionen des mit dem Angiotropin-Komplex assoziierten RNA-Bestandteils ARNA I bei der Differenzierung von Endothelzellen zu kapillaren Zellen im Rahmen der Angiogenese genutzt werden können.  
15

Die im nativen Angiotropin vorliegende ARNA I(s)-Sequenz ist partiell komplementär zur Intron-Sequenz der Pseudo-ARNA-I-Sequenz. Das Antisinn-Transkript des Pseudo-ARNA I-Gens stellt daher wohl  
20 das Vorläufertranskript für die ARNA I(s) dar. Dieses Antisinn-Transkript wird analog einer prä-mRNA transkribiert und enthält die ARNA I(s) als Intron. Aus diesem Transkript wird dann ARNA I(s)-Form, gegebenenfalls in circularer Form, gespleißt. Die potentielle Generierung der ARNA I(s)-Sequenz ist in  
25 Figur 3 dargestellt. Die ARNA I(s)-Sequenz liegt vermutlich circular vor. Durch Assoziation des ARNA I(s)-Moleküls mit ARP und  $\text{Cu}^{2+}$ - und/oder gegebenenfalls Zink-, Calcium-, Kalium- und/oder Natrium-Ionen wird der vollständige Metallo-RNP-Komplex Angiotropin konstituiert. Bei Bedarf wird dieser Kom-  
30

- 35 -

plex aus der Zelle sezerniert, diffundiert zu den Endothelzellen und gelangt mittels Endocytose oder über einen Rezeptor in das Zellinnere der Endothelzellen. Dort lagert sich die einsträngige ARNA I(s)-Sequenz an homologe Bereiche der prä-mRNA beziehungsweise mRNA des L27a-Gens, so dass diese nicht mehr als Transkriptionsmatrize zur Synthese des ribosomalen L27a-Proteins fungieren kann. Da außerdem in der Proteinbindungsdomäne des ARNA I(s)-Moleküls ein zur Konsensus-Sequenz der Hammerhead-Ribozyme homologer Sequenzabschnitt identifiziert wurde, könnte zudem eine sequenzspezifische Hydrolyse der prä-mRNA beziehungsweise mRNA des L27a-Gens erfolgen. Auch dies hätte zur Folge, dass die Synthese des ribosomalen L27a-Proteins unterbrochen wird. Da sich ohne das L27a-Protein jedoch keine funktionsfähigen Ribosomen konstituieren können, führt dies zur vollständigen Inhibition der gesamten zellulären Translation. Dies wiederum bewirkt, dass Endothelzellen nicht mehr proliferieren könnten. Dass Angiotropin die Proliferation von Endothelzellen hemmt, wurde experimentell nachgewiesen (Höckel et al. 1987; Noll 1998). Sobald kein Angiotropin mehr in den Zellen vorhanden ist, kann deren Proliferation wieder stattfinden, so dass dieser Prozess reversibel ist. Die durch die Hemmung der zellulären Translation erzwungene Umstellung des Stoffwechsels der Zelle führt dann zu der experimentell nachgewiesenen Differenzierung von Endothelzellen zu kapillären Zellen.

In der erfindungsgemäß vorgesehenen Verfahrensweise zur Angiotropin-induzierten Differenzierung von Zellen, insbesondere stark proliferierenden Zellen,

- 36 -

wie Tumorzellen und Stammzellen, aber auch Endothelzellen und Nervenzellen, unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäure-Molekülen, die insbesondere eine Bindung an die mRNA des L27a-Gens ermöglichen, zum Beispiel die Sequenzen der SEQ ID Nr. 1 bis 5, 10 und 11, nimmt die Inhibition des ribosomalen L27a-Proteins eine Schlüsselstelle ein. Wie vorstehend erwähnt, wird die mRNA dieses Proteins in Karzinomzellen gegenüber der mRNA anderer ribosomaler Proteine stark überexprimiert, so dass ein direkter Zusammenhang zwischen diesem Protein und einer verstärkten Zellproliferation besteht. Erfindungsgemäß besteht daher die Möglichkeit, Karzinomzellen direkt zu behandeln, indem ARNA I-Sequenzen umfassende Angiotropin-Komplexe in diese Zellen eingeschleust werden. Die ARNA I-Sequenzen führen in den Karzinomzellen zu einer direkten Hemmung der L27a-Translation und damit zu einer Hemmung der Proliferation dieser Zellen.

Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Reduktion der Proliferation von Zellen und/oder zur vorzeitigen Einleitung der Differenzierung dieser Zellen, wobei ein Nucleinsäuremolekül der vorliegenden Erfindung, insbesondere ein Nucleinsäuremolekül dargestellt in einer der SEQ ID Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 10 und/oder 11, ein diese Nucleinsäuremoleküle enthaltener Vektor, ein diese Moleküle oder Vektoren enthaltene Wirtszelle, eine diese Nucleinsäuremoleküle enthaltender Komplex und/oder ein Antikörper gegen diesen Komplex in die Zelle eingeschleust wird, dabei die Aktivität und/oder Expression des L27a-Gens oder davon codierten Genproduktes gehemmt oder reduziert und so die Proliferation

- 37 -

der Zelle reduziert oder gehemmt wird sowie gegebenenfalls dadurch eine vorzeitige Einleitung der Differenzierung erfolgt. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens handelt es sich also bei den Zellen um stark proliferierende Zellen, insbesondere Stammzellen, Tumorzellen und Zellen, die zum Beispiel aufgrund pathogener Prozesse degeneriert sind und stark proliferieren, aber auch um Endothelzellen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den Zellen um krankhaft veränderte Zellen, beispielsweise um Zellen, die bei der Schuppenflechte (Psoriasis-Formenkreis) entstehen. In weiteren bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei den Zellen um Nervenzellen.

In bevorzugter Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist es vorgesehen, in dem Nucleinsäurekomplex der vorgenannten Art ein Protein einzusetzen, welches einerseits das Nucleinsäuremolekül bindet, andererseits aber auch Spezifität im Hinblick auf die zu transformierende Zielzelle aufweist. Ein solches Molekül kann Calgranulin C oder ARP oder ein ähnliches Protein sein. Ein ähnliches Protein im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist ein Protein, welches eine Bindung an ein Nucleinsäuremolekül der vorliegenden Erfindung, insbesondere der vorstehend definierten Art ermöglicht, insbesondere eine Bindungsdomäne von Calgranulin C oder ARP an das Nucleinsäuremolekül aufweist. Dieses Protein weist erfindungsgemäß Erkennungsstellen auf, die eine spezifische Erkennung, Bindung und Penetration von bestimmten zu transformierenden Zielzellen ermöglicht, so dass nicht

- 38 -

sämtliche Zellen des behandelten Organismus erfasst werden. Aufgrund der durch diese Bindungs- und Erkennungsstellen des Proteins vermittelten Spezifität ist es möglich, einzelne Zelltypen in einem Organismus gezielt den erfindungsgemäß erzielten Effekten auszusetzen, das heißt beispielsweise diese Zellen mittels der erfindungsgemäß vorgesehenen Wirkung dosisabhängig entweder zu töten oder die Proliferation zu unterbinden und die Differenzierung einzuleiten.

Die Erfindung betrifft auch Vektoren, enthaltend eine Nucleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung, gegebenenfalls zusammen mit regulatorischen Elementen, Elementen, die die Replikation in einem Wirt ermöglichen, Elementen, die die Selektion mit dem Vektor transformierter Zellen ermöglichen oder sonstigen im Stand der Technik bekannten Elementen. Erfindungsgemäß kann der Vektor zum Beispiel ein Cosmid, Phage oder Plasmid sein.

Die Erfindung betrifft auch Wirtszellen, die derartige Vektoren enthalten. Derartige Wirtszellen können bakterielle, pflanzliche, tierische oder menschliche Zellen sein, zum Beispiel Primatenzellen, Mauszellen, Hamsterzellen oder auch Insektenzellen.

Wie vorstehend erläutert, erfasst die Erfindung auch Nucleinsäurekomplexe, umfassend mindestens ein Nucleinsäuremolekül der vorliegenden Erfindung, entweder zusammen mit mindestens einem Metallion und/oder einem Protein. Das Protein kann beispielsweise aus der Familie der S100-Proteine (Dell'Ange-

lica et al., a.a.O.) stammen, insbesondere ein humanes oder porcines Calgranulin C oder Angiotropin-related-Proteinmolekül sein. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem S100-Protein ein Protein mit zwei Calciumbindungsmotiven verstanden, die als EF-Handstrukturen bezeichnet werden, insbesondere ein Protein mit einer Aminosäuresequenzidentität von mindestens 50 %, mindestens 60 %, mindestens 70 %, mindestens 80 %, mindestens 90 % und bevorzugt mindestens 95 %, 97 % und 99 % zu humanem ARP. Als Metallion können beispielsweise  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{K}^{+}$ -,  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen verwendet werden.

Ein erfindungsgemäßer Nucleinsäurekomplex umfassend ein Nucleinsäuremolekül und ein Protein oder dessen Bestandteil, zum Beispiel Oligopeptid oder Polypeptid, wird auch als Ribonucleotidpolypeptid und, wenn dieser Metallionen enthält, als metallhaltiges Ribonucleotidpolypeptid bezeichnet. Derartige Komplexe können chemische, radioaktive oder fluoreszente Markierungen, auch mit cytotoxischer Wirkung, aufweisen.

Die Erfindung betrifft auch Antikörper, insbesondere monoclonale oder polyclonale Antikörper, die spezifisch einen der vorgenannten Nucleinsäure-Komplexe erkennen und binden können.

Die Erfindung betrifft auch mindestens eins der vorstehend genannten Agenzien enthaltende diagnostische oder pharmazeutische Zusammensetzungen, wobei derartige Agenzien die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren, Vektoren, Wirtszellen, Nucleinsäure-



- 40 -

Komplexe oder Antikörper sein können. Diese Zusammensetzungen weisen weiterhin gegebenenfalls Zusatz- oder Hilfsstoffe, wie pharmazeutisch verträgliche Träger, Farbstoffe, Aromastoffe, Süßungsmittel, Verdickungsmittel, Trennmittel, Säuerungsmittel, Gleitmittel, Konservierungsmittel oder ähnliches auf. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können zur spezifischen Beeinflussung der Angiomorphogenese und des vaskulären Zustands eines Gewebes des Körpers von Organismen, zur Übertragung genetischer Informationen in Zellen, zur selektiven Veränderung des Nucleinsäuregehaltes von Zellen, zur Induzierung angiogenetischer Prozesse und/oder zur Wundheilung, zur Hemmung angiogenetischer Prozesse und/oder zur Bekämpfung von Tumoren eingesetzt werden. Erfindungsgemäß ist es auch möglich, die vorstehend genannten Agenzien zur zellselektiven reversiblen Inhibierung der Proteinbiosynthese, zum Beispiel in Endothelzellen, zur Inhibierung von Blutendothelzellen, zur spezifischen in vivo oder in vitro Beeinflussung der Blutgefäßbildung, insbesondere bei Herz- und Gefäßerkrankungen, in der Transplantationschirurgie oder zur Inhibition des Wachstums von Tumoren ebenso wie in der Wundheilung einzusetzen. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäurekomplexe weisen auch eine zellselektive morphogene Wirkung in vitro auf isolierte primäre und/oder clonierte Blutkapillarendothelzellen in Kultur zur nichtmitogenen Induktion der Änderung des Zellphänotyps aus dem konfluenten Zustand oder/und zur nichtmitogenen Änderung der spatiotemporalen suprazellulären Organisation der Zellen zu dreidimensionalen organoiden kapillarähnlichen Strukturen in Kultur auf. Schließlich sind sie zur spezifischen

- 41 -

chemotropischen Wirkung auf Blutgefäße in vivo, zur Induktion eines Richtungswachstums von Blutgefäßen in vivo und zur Induktion einer Neovaskualisierung von Geweben durch gerichtetes Einwachsen von Blutgefäßen geeignet.

Die erfindungsgemäß vorgesehenen diagnostischen und pharmazeutischen Zusammensetzungen enthalten zum Beispiel die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren und/oder Nucleinsäurekomplexe. Sie können beispielsweise subkutan, intrakutan, intramuskulär oder intravenös appliziert werden. Es sind jedoch selbstverständlich auch weitere im Stand der Technik gebräuchliche Applikationsmöglichkeiten einsetzbar. Insbesondere können die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen topisch oder systemisch eingesetzt werden.

Die diagnostischen Zusammensetzungen können zum Beispiel zur Diagnose von Veränderungen des Blutgefäßwachstums eingesetzt werden.

Erfindungsgemäß ist es auch möglich, die vorstehend genannten Agenzien zur Strukturanalyse von Nucleinsäuren, Nucleosiden oder Nucleotiden einzusetzen, zum Beispiel zur Deaminierung von Adenosin und Deoxiadenosin, zur Hydrolyse von Inosin und Deoxiinosin, zur Hydrolyse von Guanosin, zur Deaminierung von Guanin, zur Hydrolyse von Phosphorsäurediestern, zur Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern, zur Hydrolyse von Nucleinsäuresubstraten ebenso wie zur Herstellung von Nucleinsäuren in vivo und in vitro. Gegebenenfalls kann vorgesehen sein, die erfindungsgemäßen Verwendungen auch in Gegen-

- 42 -

wart von Magnesium<sup>2+</sup>-Ionen durchzuführen. Insbesondere kann erfindungsgemäß mit den vorstehend genannten Agenzien die Herstellung von Adenosin, Desoxiadenosin, Guanosin, Desoxiguanosin, Inosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin oder Xanthin durchgeführt werden.

Die Erfindung betrifft die Verwendung der vorstehend genannten Agenzien für die vorstehend genannten Zwecke, insbesondere zur Prophylaxe oder Heilung von Erkrankungen ebenso wie die Verwendung der vorstehend genannten Agenzien zur Herstellung von Arzneimitteln zur Erzielung der genannten Zwecke, insbesondere zur Prophylaxe oder Heilung von Krankheiten.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von S100-Proteinen, insbesondere ARP, Calgranulin C, oder der Nucleinsäure-Komplexe der vorgenannten Erfindung als Transportmolekül für Nucleotidsequenzen, insbesondere RNA-Moleküle.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Die folgenden Figuren und Beispiele erläutern die Erfindung.

Figur 1 zeigt die mit Hilfe des MFOLD-Programms erstellte Sekundärstruktur der humanen ARNA I-Sequenz (Antisinn).

Figur 2 zeigt in schematischer Form den Mechanismus der ARNA I(s)-induzierten Translationsinhibition über einen Antisinn-Mechanismus. Dieser Antisinn-

Mechanismus führt zur Differenzierung von Endothelzellen, wobei Kapillaren gebildet werden.

Figur 3 zeigt schematisch die Struktur der erfindungsgemäßen Pseudo-ARNA I-Sequenz (oben: Sinnstrang, unten: Antisinnstrang).

Das Sequenzprotokoll (alle Sequenzen sind in 5' zu 3'-Orientierung dargestellt) umfasst:

SEQ ID Nr. 1 zeigt 42 Nucleotide der humanen, spezifischen ARNA I-Sequenz, die in der entsprechenden porcinen ARNA I-Sequenz nicht nachgewiesen wurden (Sinn-Orientierung).

SEQ ID Nr. 2 zeigt 42 Nucleotide der humanen, spezifischen ARNA-I-Sequenz von SEQ ID Nr. 1 in Antisinn-Orientierung.

SEQ ID Nr. 3 zeigt die vollständige, 205 Nucleotide umfassende Sequenz der humanen ARNA I-Sequenz, die den 163 Nucleotide umfassenden Sequenzteil umfasst, der identisch mit der Sequenz der porcinen ARNA I-Sequenz ist, in Sinn-Orientierung.

SEQ ID Nr. 4 zeigt die vollständige, 205 Nucleotide umfassende Sequenz der humanen ARNA I-Sequenz von SEQ ID Nr. 3 in Antisinn-Orientierung.

SEQ ID Nr. 5 zeigt die 235 Nucleotide umfassende Sequenz der humanen Pseudo-ARNA I-Sequenz (Sinn-Orientierung), inclusive der am 5' Ende vorhandenen ARNA I Nucleotide 1 bis 63 in Antisinn-Orientierung.

- 44 -

SEQ ID Nr. 6 zeigt die Sequenz des zur Isolierung der humanen ARNA I-Sequenz verwendeten Primers ARNA I (forward).

5 SEQ ID Nr. 7 zeigt die Sequenz des zur Isolierung der humanen ARNA I-Sequenz verwendeten Primers ARNA I (reverse).

SEQ ID Nr. 8 zeigt einen Teilabschnitt der humanen ARNA-I Sequenz (Sinnorientierung) mit potentieller ribozymatischer Aktivität.

10 SEQ ID Nr. 9 zeigt die Sequenz von SEQ ID Nr. 8 in Antisinnorientierung.

SEQ ID Nr. 10 zeigt die in SEQ ID Nr. 5 erwähnten 63 Nucleotide der humanen ARNA I in Sinn-Orientierung.

15 SEQ ID Nr. 11 zeigt die in SEQ ID Nr. 5 erwähnten 63 Nucleotide der humanen ARNA I in Antisinn-Orientierung.

20 SEQ ID Nr. 12 zeigt den im Haarnadelschleifenbereich gelegenen Konsensusbereich zwischen ARNA I(s) und ARNA II(as) Sequenzen in Sinn-Orientierung.

SEQ ID Nr. 13 zeigt die Sequenz von SEQ ID Nr. 12 in Antisinn-Orientierung.

25 SEQ ID Nr. 14 zeigt den 19 Nucleotide mit besonderer Humanspezifität aufweisenden Bereich der SEQ ID Nr. 1 in Sinn-Orientierung.

- 45 -

SEQ ID Nr. 15 zeigt den 19 Nucleotide umfassenden  
besonders humanspezifischen Bereich der SEQ ID Nr.  
2 in Antisinn-Orientierung.

- 46 -

## Beispiel 1

Identifizierung von ARNA I-Sequenzen in humanem Probenmaterial

- Voruntersuchungen mittels RT-PCR unter Verwendung
- 5 verschiedener Primer hatten gezeigt, dass zur porcinen ARNA I-Sequenz homologe Nucleinsäuren sowohl in kommerzieller humaner Plazenta-Gesamt-RNA als auch in Con A-stimulierter Leukocyten-Gesamt-RNA nachgewiesen werden konnten.
- 10 Zur Clonierung der humanen ARNA I-Sequenz wurde Gesamt-RNA von humaner Plazenta unter Verwendung des Primers ARNA I (forward) (SEQ ID Nr. 6), der eine Eco RI-Schnittstelle enthält, und des Primers ARNA I (reverse) (SEQ ID Nr. 7), der eine Bam HI-
- 15 Restriktionsstelle enthält, einer RT-PCR unterworfen. Die erhaltenen Amplifikationsprodukte wurden mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Bam HI gespalten und einer gelelektrophoretischen Aufreinigung auf einem 2,5%-igen Agarose-Gel unterworfen.
- 20 Nach Aufreinigung der Fragmente wurden diese in den Vektor pUC 19 cloniert, der zuvor mit Eco RI und Bam HI gespalten worden war. Nach Transformation und Selektion geeigneter Transformanten wurde die Sequenz der Insertionen im Clonierungsvektor bestimmt. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des
- 25 Dye Terminator Cycle Sequencing Kits und des ABI PRISM 377A DNA-Sequencers. Die dabei erhaltenen vollständigen und partiellen Sequenzen von ARNA I(s), ARNA I(as) und Pseudo-ARNA I sind in SEQ ID
- 30 Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 5 und 8 bis 15 gezeigt. In Fi-

gur 3 wird in schematischer Weise die Pseudo-ARNA I-Sequenz gezeigt. Der obere Bereich stellt die 5'-3' Orientierung eines Sinntranskripts von der Pseudo-ARNA I in prä-mRNA Form dar, also das potentielle L27a Exon I und das potentielle Intron umfassend die ARNA I-Nucleotide Nr. 64-205 und 1-63, beide in Antisinn-Orientierung, L27a Exon II und Poly A Schwanz (in 5' zu 3' Richtung). Dabei stellen die Nucleotide 50-63 der ARNA I(as) einen gemeinsamen Sequenzabschnitt zwischen ARNA I(as) und dem Bereich des Pseudo-ARNA I Transkripts dar, der homolog zum 5'-Ende des Exon II von L27a ist. Die 3' Spleißstelle der prä-mRNA von L27a beziehungsweise möglicherweise auch der Pseudo-ARNA I(s) Sequenz liegt im mit dem Doppelpfeil gekennzeichneten Bereich. Im darunter gelegenen Bereich wird in 3'-5'-Orientierung (Antisinn-Transkript) dargestellt, wie das entsprechende Antisinn-Transkript der Pseudo-ARNA I-Sequenz aufgebaut ist, nämlich (in 3' zu 5' Richtung): L27a Exon I in Antisinn, Intron aus ARNA I Nt 142-1 und ARNA I Nt 205-143 beide in Sinn-Orientierung, L27a Exon I (Antisinn). Der potentielle Intronbereich der Pseudo-ARNA I-Sequenz wird durch die ARNA I(as) Bereiche 64 bis 205 und 1 bis 63 konstituiert. Im Antisinn-Transkript der Pseudo-ARNA I (unterer Bereich) befindet sich der entsprechende Intronbereich ARNA I(s) 142 bis 1 und ARNA I(s) 205 bis 143, der als Template für die Generierung einer zirkulären ARNA I(s)-Sequenz dient. Mittels des dargestellten Pfeils wird die potentielle Zirkularisierung dieser Sequenz dargestellt. Dabei kennzeichnet die Pfeilspitze die Position der 5'- und das Pfeilende die Position der 3'-Spleiß-Stelle der ARNA I(s) innerhalb des Antisinn-Transkriptes



- 48 -

der Pseudo-ARNA I-Sequenz. Die Nucleotide 143-156 der ARNA I(s) können ab der Position der 3' Spleißstelle des Exons II der mRNA beziehungsweise prä-mRNA des L27a-Gens gegen dieses Exon hybridisieren.

## 5 Beispiel 2

### In vitro-RNA-Synthese von ARNA I-Sequenzen

Die clonierten ARNA I-Sequenzen wurden als Matrizen zur in vitro-RNA-Synthese verwendet. Dazu wurden via PCR blunt-end DNA-Templates hergestellt, die  
10 eine definierte Terminierung des nachfolgenden RNA-Transkripts ermöglichten. Diese DNA-Templats enthielten am 5'-Ende eine Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase und 3'-terminal zur Promotorsequenz die gewünschte DNA-Sequenz, deren RNA synthetisiert  
15 werden sollte. Die RNA-Synthese erfolgte unter Verwendung hochkonzentrierter T7-RNA-Polymerase nach dem Verfahren von Milligan und Uhlenbeck (1989), wobei die RNA-Synthese jedoch über 18 h durchgeführt wurde. Nach der Synthese wurde die RNA mit-  
20 tels DNase-Behandlung und Phenol/Chloroform-Behandlung gereinigt. Nach Aufreinigung der RNA mittels Mikrokonzentrationen von Amicon (optional auch ersetzt durch Ethanolfüllung) konnte die so synthetisierte RNA zur in vitro-Rekonstitution ternärer Angiotropin-Komplexe eingesetzt werden.  
25

## Beispiel 3

### Rekonstitution ternärer Angiotropin-Komplexe

Zur Rekonstitution ternärer Angiotropin-Komplexe wurde die in Beispiel 2 synthetisierte RNA einge-

- 49 -

setzt. Als Protein-Komponente wurde intrazellulär isoliertes und aufgereinigtes porcines Calgranulin C aus Schweine-Granulocyten verwendet. Außerdem wurde  $\text{CuCl}_2$  eingesetzt. Da das Konzentrations-  
5 verhältnis zwischen RNA und Calgranulin C bisher experimentell nicht eindeutig quantifiziert werden konnte (Kuhn 1998), erfolgte die Rekonstitution der ternären Komplexe unter Verwendung verschiedener Konzentrationen. Nach einer 1-stündigen Inkubation  
10 bei 37°C wurden die Komplexe mit Pufferlösung 1:100 verdünnt.

#### Beispiel 4

##### 15 Bestimmung der angiogenetischen Aktivität mittels des CAM-Tests

Der CAM-Test wurde durchgeführt wie von Noll (1998) und Kuhn (1998) beschrieben.

Positive angiogenetische Reaktionen wurden entsprechend der Ausbildung von Blutgefäßen im Bereich der aufgetragenen Probe entweder mit „++++“ (sehr starke Erhöhung der Anzahl von Kapillarnetzstrukturen),  
20 „+++“ (starke Erhöhung der Anzahl von Kapillarnetzstrukturen), „++“ (leichte Erhöhung der Anzahl von Kapillarnetzstrukturen), „+“ (sehr geringe Erhöhung der Anzahl von Kapillarnetzstrukturen) oder „0“  
25 (keine Veränderung; entspricht der Reaktion auf Puffer ohne Substrat). Eine Verringerung der Anzahl der Kapillarnetzstrukturen wurde mit „-“ beurteilt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst.  
30

- 50 -

Tabelle

| Probe   | Substratdosis [fmol] |        |                   | Angiogene-<br>tischer<br>Effekt |
|---|----------------------|--------|-------------------|---------------------------------|
|   | Protein              | RNA    | CuCl <sub>2</sub> |                                 |
| ARNA I(sense)/CalC/Cu <sup>2+</sup>             | 5,6                  | 22,4   | 5,6               | letal                           |
| ARNA I(sense)/Cu <sup>2+</sup>                  | 0                    | 22,4   | 5,6               | letal                           |
| ARNA I(sense)/CalC/Cu <sup>2+</sup>             | 5,6                  | 0,224  | 5,6               | ++++                            |
| ARNA I(sense)<br>/CalC(rekom.)/Cu <sup>2+</sup> | 5,6                  | 0,224  | 5,6               | +++                             |
| ARNA I(sense)/Cu <sup>2+</sup>                  | 0                    | 0,224  | 5,6               | +++                             |
| ARNA I(antisense)/CalC/Cu <sup>2+</sup>         | 5,6                  | 0,224  | 5,6               | letal                           |
| ARNA I(antisense)/Cu <sup>2+</sup>              | 0                    | 0,224  | 5,6               | letal                           |
| ARNA I(antisense)/CalC/Cu <sup>2+</sup>         | 5,6                  | 0,0224 | 5,6               | -                               |
| ARNA I(antisense)/Cu <sup>2+</sup>              | 0                    | 0,0224 | 5,6               | -                               |
| CalC/Cu <sup>2+</sup>                           | 5,6                  | 0      | 5,6               | 0                               |

CAM-Testserie mittels PCR-Template synthetisierter  
ARNA I

## Beispiel 5

Mechanismus der ARNA I-regulierten Angiogenese des  
Angiotropins mittels Antisense-Inhibierung

Figur 2 stellt schematisch den zellulären Mechanismus der durch native humane ARNA I(s) induzierten Translationsinhibition mittels Antisinn-Mechanismus dar. Die in Leukozyten 50 generierte ARNA I(s) (als 10 in Figur 2 bezeichnet) stellt das Antisinn-Transkript des Pseudo-ARNA I-Gens mit der schwarz dargestellten ARNA I(s)-Sequenz als Intron-Sequenz dar. Diese Intron-Sequenz umfasst die vollständige Sequenz von ARNA I(s) (SEQ ID Nr. 3), die somit einem zellulären Spleiß-Mechanismus unterliegt. Das Genprodukt des Pseudo-ARNA-Gens befindet sich daher nicht beziehungsweise nicht nur auf dem Sinnstrang, sondern vielmehr auf dem Antisinnstrang. Damit ist das Antisinn-Transkript das funktionelle Transkript dieses Gens. Das Antisinntranskript des Pseudo-ARNA I-Gens stellt das Vorläufertranskript für die ARNA I(s) dar. Durch Assoziation der herausgespleißten, vermutlich circularisierten ARNA I(s) (15) mit ARP 18 und  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen wird der erfindungsgemäße vollständige Metallo-RNP-Komplex Angiotropin 20 konstituiert. Der Metallo-RNP-Komplex Angiotropin (als 20 bezeichnet) wird bei Bedarf in den extrazellulären Raum 30 sezerniert und diffundiert zu den Endothelzellen 40. In diesen hybridisiert die ARNA I(s) 15 gegen die prä-mRNA 60 beziehungsweise mRNA des L27a-Gens beziehungsweise direkt gegen das L27a-Gen auf Transkriptionsebene. Dadurch wird die Synthese des ribosomalen L27a-Proteins inhibiert. Da inner-

halb einer Haarnadelschleife der ARNA I(s) 15 eine  
Konsensussequenz zum Hammerhead-Ribozym identi-  
fiziert wurde, kann gegebenenfalls darüber hinaus  
noch eine sequenzspezifische Hydrolyse der prä-mRNA  
5 beziehungsweise der mRNA des L27a-Gens stattfinden.

Ohne ribosomales L27a-Protein kann keine Bildung  
von funktionsfähigen Ribosomen stattfinden. Die In-  
hibition der Translation ist die Folge, so dass die  
zelluläre Proteinbiosynthese gestoppt wird. Die En-  
10 dothelzellen können nicht mehr proliferieren und  
erhalten dadurch die benötigte Zeit zur Umdifferen-  
zierung in Kapillaren 70. Dieser Effekt scheint re-  
versibel zu sein, da, wenn keine weitere ARNA I(s)-  
RNA 15 in die Endothelzellen eingeschleust wird,  
Proliferation wieder stattfindet.

Das vorgenannte System kann als Modellsystem für  
den zellselektiven RNA-Transfer und die Stabilisie-  
rung von RNA bei Antisinn- und Ribozymstrategien  
herangezogen werden. Die Erfindung erfasst daher  
20 auch endothelspezifische Transfektionskits.

Insbesondere erlaubt es die Erfindung hinsichtlich  
der ARNA I(s)-Sequenz und diese enthaltenden Nuc-  
leinsäure-Komplexe Wunden zu heilen, koronare Herz-  
kranzgefäßerkrankungen zu heilen und eine verbes-  
25 serte Transplantationschirurgie durchzuführen. Die  
erfindungsgemäße ARNA I(s)-Sequenz und diese ent-  
haltende Nucleinsäurekomplexe können darüber hinaus  
auch zur Induktion des Wachstums von Nervenzellen  
verwendet werden.

- 53 -

Hinsichtlich der ARNA I(as)-Sequenz und diese enthaltenden Nucleinsäure-Komplexen ist es möglich, die Tumorangiogenese zu inhibieren und Gentherapien zum Beispiel bei Hämangiomen durchzuführen.

Literatur

- Akhtar S., Basu S., Wickstrom E. und Juliano R.L. (1991). Interactions of antisense DNA oligonucleotide analogs with phospholipid membranes (liposomes). Nucl. Acids Res. 19, 5551-5559.  
5
- Dell'Angelica E.C., Schleicher C.H., Santomé J.A. (1994). Primary structure and binding properties of calgranulin C, a novel S100-like calcium-binding protein from pig granulocytes. J. Biol. Chem. 269, 28929-28936.  
10
- Felgner J.H., Kumar R., Sridhar C.N., Wheeler C.J., Tsai Y.J., Border R., Ramsey P., Martin M. und Felgner P.L. (1994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. J. Biol. Chem. 269, 2550-2561.  
15
- Folkman J. (1971). Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. New Engl. J. Med. 285, 1182-1186.
- Folkman J. (1995a). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nature Medicine 1, 27-30.  
20
- Folkman J. (1995b). Clinical applications of research on angiogenesis. New Engl. J. Med. 333, 1757-1763.
- Folkman J. und Shing Y. (1992). Angiogenesis. J. Biol Chem. 267, 10931-10934.  
25
- Frigerio, Dagorn J.-C., Iowanna J.L. (1995). Cloning, sequencing and expression of L5, L21, L27a,

L28, S5, S9, S10 and human ribosomal protein mRNAs.  
Biochim. Biophys. Acta 1262, 64-68.

Haseloff, J. und Gerlach, W.L. (1988). Simple RNA  
enzymes with new and highly specific endoribonucle-  
5 ase activities. Nature 334, 585-591.

Heidenreich O., Pieken W. und Eckstein F. (1993).  
Chemically modified RNA: approaches and applica-  
tions. FASEB 7, 90-96.

Hertig (1935). Angiogenesis in the early human cho-  
10 rion and in the primary placenta of the macaque  
monkey. Contr. Embryol. 25, 37-81.

Höckel M. (1988). THERAPEUTISCHE ANGIOGENESE. Un-  
tersuchungen zur biologischen Wirkungsweise des mo-  
nozytären Angiogenesefaktors Angiotropin und zu  
15 Möglichkeiten seines Einsatzes in der operativen  
Medizin. Habilitationsschrift. Johannes Gutenberg-  
Universität Mainz.

Höckel M., Beck T., Wissler J.H. (1984). Neomorpho-  
genesis of blood vessels in rabbit skin by a highly  
20 purified polypeptide mediator (monocyto-  
angiotropin) and associated tissue reactions. Int.  
J. Tissue React. 6, 323-331.

Höckel M., Sasse J., Wissler J.H. (1986). Mecha-  
nisms in angiogenesis action of a monocytic blood  
25 vessel morphogen (angiotropin): In vitro studies on  
motility, differentiation and spatial organization  
of cloned capillary endothelial cells. Prot. Biol.  
Fluids 34, 517-524.



- 56 -

- Höckel M., Sasse J. und Wissler J.H. (1987). Purified monocyte-derived angiogenic substance (angiotropin) stimulates migration, phenotypic changes and „tube formation“ but not proliferation of capillary endothelial cells in vitro. J. Cell. Physiol. 133, 1-13.
- Isobe et al. (1981). Eur. J. Bioch. 116, 79-86
- Jaeger J.A., Turner D. H. und Zuker M. (1989). Improved Predictions of Secondary Structures for RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry 86, 7706-7710.
- Jaeger J.A., Turner D. H. und Zuker M. (1990). Predicting Optimal and Suboptimal Secondary Structure for RNA. In "Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences", R. F. Doolittle ed.. Methods in Enzymology, 183, 281-306
- Klingmann und Hilt (1988). TIBS 13, 437-443
- Kretsinger (1980). Critical Reviews in Biochemistry, Cleveland, 119-174
- Kuhn E., Noll M., Koch-Pelster B. Seibt J.-V., Kieseewetter S., Wissler J.H. (1996). Insights to the molecular mode of action of Angiotropin, an extracellular RNP mediator for organoid capillary pattern formation from porcine leukocytes. Biol. Chem. (Hoppe-Seyler) 377, 195.
- Kuhn E. (1998). Charakterisierung der Proteinkomponente eines morphogenetisch aktiven Metallo-Ribonukleoproteins aus Leukozyten des Schweins.

Dissertation, Universität Hohenheim, Fraunhofer IRG Verlag.

5 Milligan J.F., Uhlenbeck O.C. (1989). Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymrase. Meth. Enzym. 180, 51-62.

Moncrief et al. (1990). J. Mol. Evol. 30, 522-562

10 Noll M. (1998). Neomorphogenese von Blutgefäßmustern in vitro: Untersuchungen zu biologischen und molekularen Funktionen eines leukozytären Angiogenesefaktors (Angiotropin). Dissertation, Universität Hohenheim, Fraunhofer IRB Verlag.

15 Padgett, R.A., Konarska, M.M., Grabowski, P.J., Hardy, S.F. und Sharp, P.A. (1984). Lariats as intermediats and products in the splicing of messenger RNA precursors. Science 225, 898-903

20 Perreault J.-P., Labuda D., Usman N., Yang J.-H. und Cedergren R. (1991). Relationship between 2'-hydroxyls and magnesium binding in the hammerhead RNA domain: A model for ribozyme catalysis. Biochem. 30, 4020-4025.

Reed, R. und Maniatis T. (1985). Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing. Cell 41, 95-105.

25 Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (second edition), Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor

Schäfer und Heizmann (1996). TIBS 21, 134-140

Seibt V. (1998). Funktion und Klonierung des Proteinteils eines angiomorphogenetisch aktiven, leukozytären Ribonukleoproteins aus *Sus scrofa*. Dissertation, Universität Hohenheim Fraunhofer IRB Verlag, 202 S.

Stampfer MR; Yaswen P (1993). Culture systems for study of human mammary epithelial cell proliferation, differentiation and transformation. Cancer Surv., 18, 7-34.

von Wangenheim K.H., Peterson H.P. (1998). Control of cell proliferation by progress in differentiation: clues to mechanisms of aging, cancer causation and therapy. J. Theor. Biol. 193:4, 663-78.

15 Wissler J.H. (1982). Inflammatory mediators and wound hormones: Chemical signals for differentiation and morphogenesis in tissue regeneration and healing. In Jaenicke L. (ed.): Proc. 33th Mosbach Coll. 1982: Biochemistry of Differentiation and  
20 Morphogenesis, Springer-Verlag, 257-274.

Wissler J.H. (1984). Large scale and biotechniques for the production and isolation of leucocytic effector substances of regenerative tissue morphogenesis by culturing cells in serum-free, synthetic  
25 fluids: Design, preparation and use of a novel medium. Blood Cells Nucl. Med. 7/2, 393-471.

Wissler J.H., Logemann E., Meyer H.E., Krützfeldt B., Höckel M. und Heilmeyer jr. L.M.G. (1986). Structure and function of a monocytic blood vessel

morphogen (angiotropin) for angiogenesis in vivo and in vitro: A copper-containing metallo-polyribonucleo-polypeptide as a novel and unique type of monokine. *Protides Biol. Fluids* 34, 525-536.

Wissler J.H. und Renner H. (1981). Inflammation, chemotropisms and morphogenesis: Novel leucocyte-derived mediators for directional growth of blood vessels and regulation of tissue neovascularization. *Z. Physiol. Chem.* 362, 244-245.

Yang et al. 1992 Yang J.-H., Usman N., Chartrand P. and Cedergren R. (1992). Minimum ribonucleotide requirement for catalysis by the RNA hammerhead domain. *Biochem.* 31, 5005-5009.

Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 244, 48-52.

## 5    Ansprüche

1. Nucleinsäuremolekül, das als funktionaler Bestandteil eines biologisch aktiven Metallo-Ribonucleoprotein-Komplexes geeignet ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- 10    a) einem Nucleinsäuremolekül, das erhältlich ist mittels reverser Transkription von Plazenta-Gesamt-RNA mit den ARNA I-spezifischen Primern mit den in SEQ ID Nr. 6 oder/und 7 dargestellten Nucleotidsequenzen, und einem Fragment davon;
- 15    b) einem Nucleinsäuremolekül, das mindestens eine der in SEQ ID Nr. 1 bis 5 oder 8 bis 15 dargestellte Nucleotidsequenz umfasst;
- 20    c) einem Nucleinsäuremolekül, das erhältlich ist durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen eines Nucleinsäuremoleküls nach a) bis b);
- 25    d) einem Nucleinsäuremolekül, das mit einem Nucleinsäuremolekül nach a) bis c) und einem Fragment davon hybridisiert, und
- 25    e) einem Nucleinsäuremolekül, das zu einem Nucleinsäuremolekül nach a) bis b) komplementär ist, und einem Fragment davon.

- 61 -

2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass es eine DNA oder RNA ist.

3. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass es Teil einer längeren  
5 nativen Nucleinsäuremoleküls ist.

4. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass es in circullärer oder in linearer Form vorliegt.

5. Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1  
10 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass es in seiner Sekundärstruktur eine Haarnadelschleife mit der Konsensus-Sequenz 5'-CUG-3', insbesondere mit der Sequenz aus SEQ ID Nr. 12 oder 13 ausbildet.

6. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die in der Sekundärstruktur des  
15 Nucleinsäuremoleküls ausgebildete Haarnadelschleife die Bindung des Nucleinsäuremoleküls an ein Protein vermittelt.

7. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die in der Sekundärstruktur des Nucleinsäuremoleküls ausgebildete  
20 Haarnadelschleife die Bindung des Nucleinsäuremoleküls an ein Angiotropin related protein-Molekül vermittelt.

8. Vektor, enthaltend ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, gegebenenfalls zusammen mit regulatorischen Elementen.  
25

- 62 -

9. Vektor nach Anspruch 8, der ein Cosmid, Phage, Liposom oder Plasmid ist.

10. Wirtszelle, enthaltend einen Vektor nach einem der Ansprüche 8 oder 9.

5 11. Nucleinsäure-Komplex, umfassend ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7 und Metallionen oder/und ein Protein.

12. Nucleinsäure-Komplex nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Protein aus der Familie  
10 der S100-Proteine stammt.

13. Nucleinsäure-Komplex nach Anspruch 11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Protein ein Angiotropin related protein-Molekül oder Calgranulin C ist.

15 14. Nucleinsäure-Komplex nach einem der Ansprüche 11 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Metallionen  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{K}^{+}$ - oder  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen sind.

15. Nucleinsäure-Komplex nach einem der Ansprüche  
20 11 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Nucleinsäure-Komplex ein Ribonucleotidpolypeptid ist.

16. Nucleinsäure-Komplex nach einem der Ansprüche 11 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass dieser ein metallhaltiges Ribonucleotidpolypeptid ist.

25 17. Antikörper, der spezifisch einen Nucleinsäure-Komplex nach einem der Ansprüche 11 bis 16 erkennt und bindet.

- 63 -

18. Antikörper nach Anspruch 17, der ein monoclonaler oder polyclonaler Antikörper ist.

19. Verfahren zum Transport eines Nucleinsäuremoleküls in eukaryontische Zellen, Zellkulturen oder  
5 Gewebe, insbesondere Zellen und Gewebe von Säugern und Vögeln, in vitro oder in vivo umfassend die folgenden Schritte:

- Modifikation des zu transportierenden Nucleinsäuremoleküls, das natürlicherweise nicht mit dem  
10 Angiotropin-Komplex und/oder ähnlichen Komplexen in Zusammenhang steht, durch Anlagerung von Sequenzen eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7, die unter geeigneten Bedingungen zur Ausbildung einer Haarnadelschleife mit  
15 der Konsensus-Sequenz 5'-CUG-3' geeignet sind;
- Herstellung eines ternären Komplexes durch in vitro Zugabe von Metall-Ionen und mindestens einem Protein zu dem modifizierten Nucleinsäuremolekül; und
- 20 - Applikation des hergestellten ternären Komplexes auf Zellen oder Gewebe, in die das modifizierte Nucleinsäuremolekül eingebracht werden soll.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das modifizierte Nucleinsäuremolekül ein Molekül mit enzymatischer Aktivität ist.  
25

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 oder 20, wobei die Metall-Ionen  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Zn}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind.



22. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 21, wobei das Protein ein ARP-Molekül, Calgranulin C oder ein ähnliches Protein, insbesondere ein das Bindemotiv von ARP oder Calgranulin C für das Nucleinsäuremolekül aufweisendes Protein ist.

23. Verfahren zur Induzierung angiogenetischer Prozesse in Gewebe eines Säugerorganismus, umfassend die folgenden Schritte:

- 10 - Herstellung eines ternären Komplexes durch Komplexierung eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in Sinn-Orientierung mit Metall-Ionen und gegebenenfalls einem Protein in vitro; und
- 15 - Applikation der komplexierten Nucleinsäure auf Gewebe, in denen der angiogenetische Prozess induziert werden soll.

24. Verfahren zur Hemmung angiogenetischer Prozesse in Gewebe eines Säugerorganismus, umfassend die folgenden Schritte:

- 20 - Herstellung eines ternären Komplexes durch Komplexierung eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in Antisinn-Orientierung mit Metall-Ionen und gegebenenfalls einem Protein in vitro; und
- 25 - Applikation der komplexierten Nucleinsäure auf Gewebe, in denen ein angiogenetischer Prozess gehemmt werden soll.

- 65 -

25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei die Metall-Ionen  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Na}^{+}$ -,  $\text{K}^{+}$ - oder  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen sind.
26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, wobei das  
5 Protein ein ARP-Molekül, Calgranulin C oder ein ähnliches Protein ist.
27. Diagnostische Zusammensetzung, umfassend ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, einen Vektor nach einem der Ansprüche 8 oder 9,  
10 eine Wirtszelle nach Anspruch 10, einen Nucleinsäure-Komplex nach einem der Ansprüche 11 bis 16 oder einen Antikörper nach einem der Ansprüche 17 oder 18 gegebenenfalls zusammen mit einem Träger.
28. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein  
15 Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, einen Vektor nach einem der Ansprüche 8 oder 9, eine Wirtszelle nach Anspruch 10, einen Nucleinsäure-Komplex nach einem der Ansprüche 11 bis 16 oder einen Antikörper nach einem der Ansprüche 17 oder  
20 18 gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.
29. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 28 zur spezifischen Beeinflussung der Angiomorphogenese und des vaskulären Zustand eines Gewebes des  
25 Körpers von Organismen.
30. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 28 zur Übertragung genetischer Informationen in Zellen.

- 66 -

31. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 28 zur selektiven Veränderung des Nucleinsäuregehaltes von Zellen.

5 32. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7, die unter geeigneten Bedingungen zur Ausbildung einer Haarnadelschleife mit der Konsensus-Sequenz 5'-CUG-3' fähig ist, zur Modifikation von Nucleinsäuremolekülen, die natürlicher Weise nicht mit dem Angiotropin-Komplex im  
10 Zusammenhang stehen, so dass diese modifizierten Nucleinsäuremoleküle unter geeigneten Bedingungen an ARP, Calgranulin C oder ähnliche Proteine binden und in Zielzellen transportiert werden können.

15 33. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7, die unter geeigneten Bedingungen zur Ausbildung einer Haarnadelschleife mit der Konsensus-Sequenz 5'-CUG-3' fähig ist, zur Isolierung und/oder zum Transport von Proteinen, an die diese Nucleinsäuremoleküle binden können und  
20 die so zum Transport von Nucleinsäuremolekülen in Zielzellen eingesetzt werden können.

34. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in Sinn-Orientierung zur Herstellung von Therapeutika zur Induzierung angio-  
25 genetischer Prozesse und/oder zur Wundheilung.

35. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in Antisinn-Orientierung zur Herstellung von Therapeutika zur Hemmung angio-  
30 genetischer Prozesse und/oder zur Bekämpfung von Tumoren.

- 67 -

36. Verwendung von ARP, Calgranulin C oder der Nucleinsäurekomplexe nach einem der Ansprüche 11 bis 16 als Transportmolekül für Nucleotidsequenzen, insbesondere RNA-Moleküle.

5 37. Verfahren zur Reduktion der Proliferation von Zellen und/oder zur vorzeitigen Einleitung der Differenzierung von Zellen, wobei ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, ein Vektor nach einem der Ansprüche 8 oder 9, eine Wirtszelle  
10 nach Anspruch 10, ein Nucleinsäurekomplex nach einem der Ansprüche 11 bis 16 und/oder ein Antikörper nach einem der Ansprüche 17 oder 18 in die Zelle eingeschleust wird und dabei die Aktivität und/oder Expression des L27a-Gens oder davon codierten Genproduktes hemmt oder reduziert.  
15

38. Verfahren nach Anspruch 37, wobei die Zelle eine stark proliferierende Zelle, insbesondere eine Stammzelle, degenerierte Zelle oder Tumorzelle ist.

39. Verfahren nach Anspruch 37, wobei die Zelle eine krankhaft veränderte Zelle, insbesondere eine Zelle des Psoriasis-Formenkreises ist.  
20

40. Verfahren nach Anspruch 37, wobei die Zelle eine Nervenzelle ist.

41. Verfahren nach einem der Ansprüche 37 bis 40, wobei ein Nucleinsäurekomplex nach einem der Ansprüche 11 bis 16 eingesetzt wird.  
25

42. Verfahren nach Anspruch 41, wobei der Nucleinsäurekomplex ein Protein aufweist, das die Bindungsdomäne von Calgranulin C oder ARP an das Nuc-

- 68 -

leinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, insbesondere die ARNA I(s)-Sequenz, und eine Bindungsdomäne an einen Oberflächenrezeptor der Zelle aufweist.

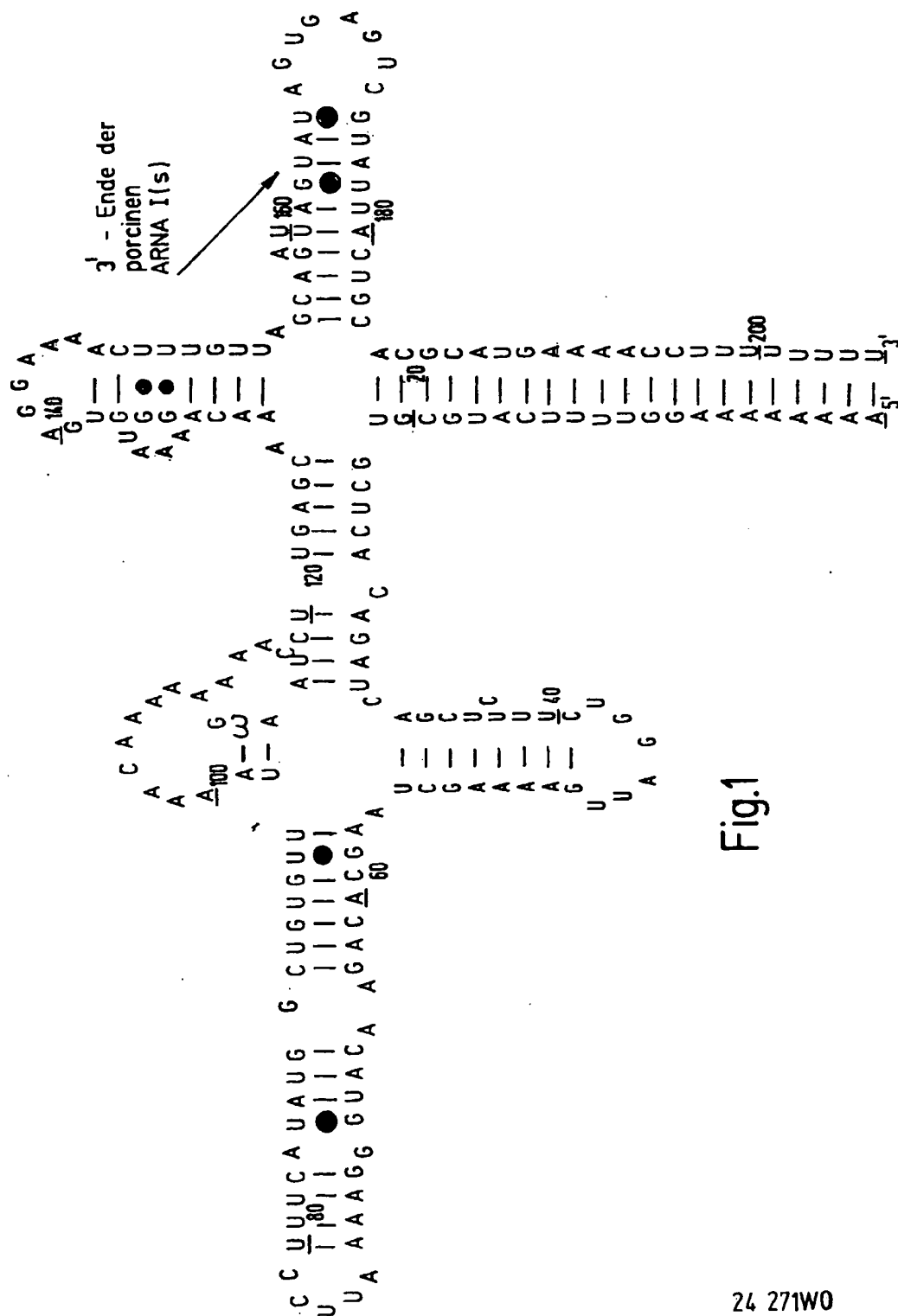


Fig. 1

24 271W0

2 / 3

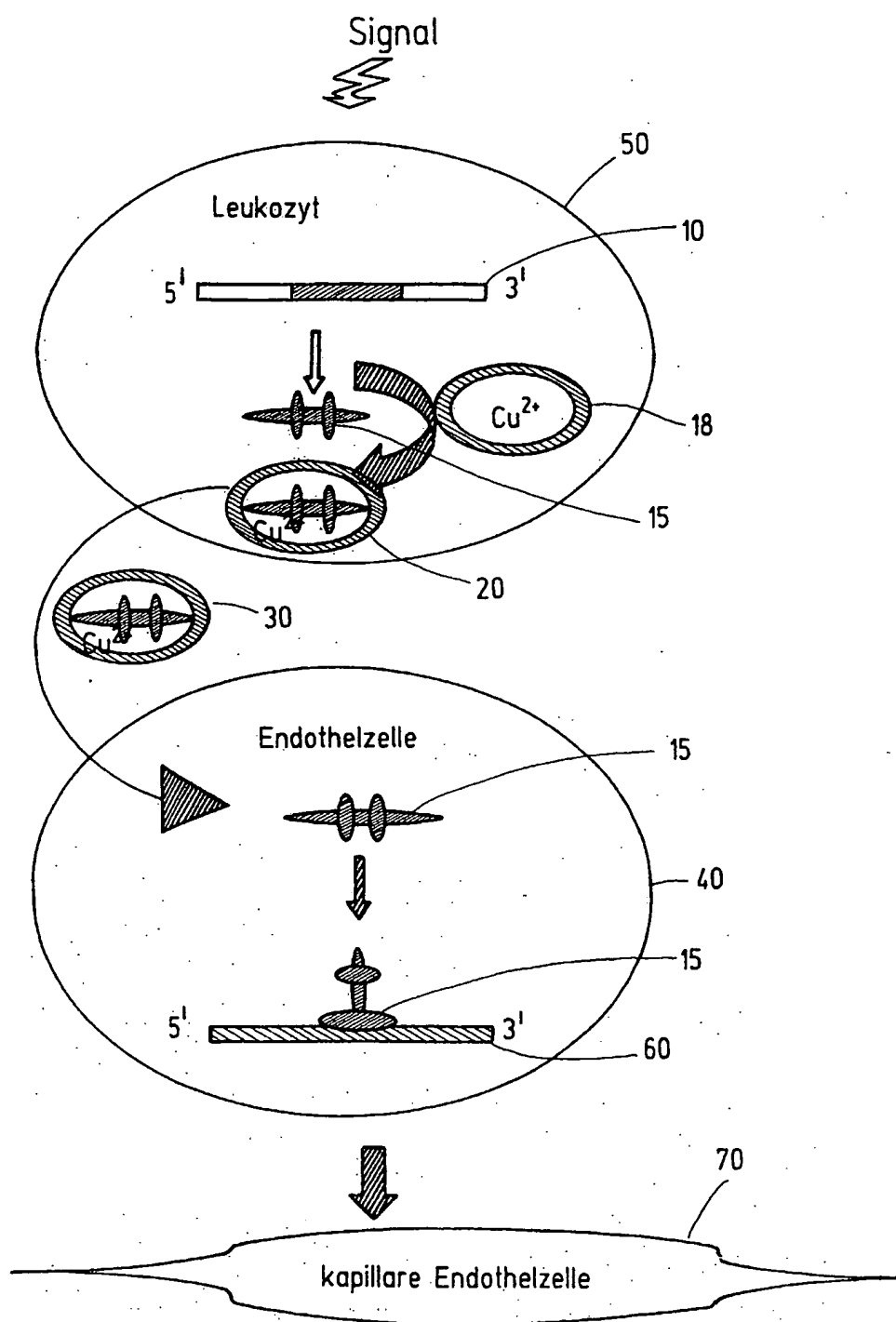


Fig.2

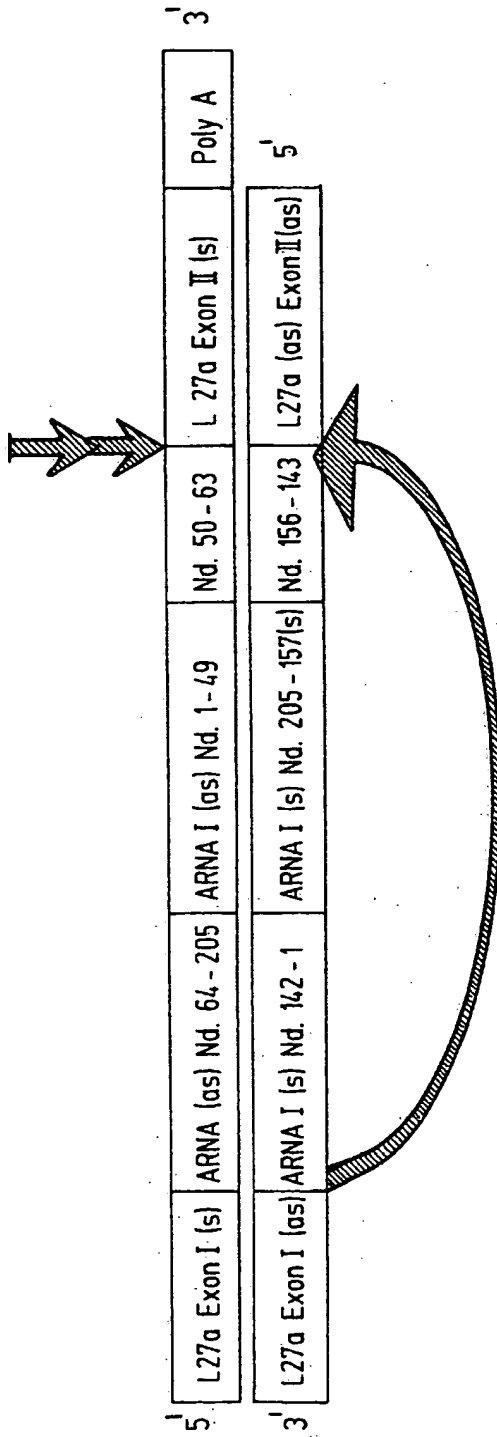


Fig.3



-1-

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Fraunhofer Gesellschaft zur Förderung...e.V.

<120> Verfahren und Mittel zur Modifikation humaner  
Angiogenese

&lt;130&gt; 16416rna

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 15

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

uauagugagu cguauuacug cacgcaugaa aaccuuuuuu uu

42

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

aaaaaaaaagg uuuucaugcg ugcaguaaua cgacucacua ua

42

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 205

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

aaaaaaaaagg uuuucaugcg ugcucacaga ucagcucuuu cuggauugaa aagcuaagca 60  
 cagaacaugg gaaaauuccu uucauauugc uguguuuaca aacaaaaagu auaaacaucu 120  
 ugagcaaaca gaaauagguga ggaaaacuuu guuagcagau uaguauagug agucguauua 180  
 cugcacgcgau gaaaaccuuu uuuuu 205

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 205

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

aaaaaaaaagg uuuucaugcg ugcaguaaua cgacucacua uacuaaucug cuaacaaagu 60  
 uuuccucacc auuucuguuu gcucaaugug uuuaauuuu uuuguuuguaa acacagccau 120  
 augaaaaggaa uuuucccaug uucugugcuu agcuuuucaa uccagaaaga gcugaucugu 180  
 gagcacgcgau gaaaaccuuu uuuuu 205

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 235

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

-2-

<400> 5  
 aaaaaaaagg uuuucaugcg ugcaguaaau cgacucacua uacuaaucug cuaacaaagu 60  
 uuugggaaag ggaaagcucc caaagcagcc ugucaucgug aaggccaaau ucuucagcag 120  
 aagagcugag gagaagauua agaguguugg gggggccugu guccuggugg cuugaagccg 180  
 cauggaggga guuucauuaa augcuaacua cuuuuucaaa aaaaaaaaaa aaaaa 235

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 gacgaattca aaaaaaaggt ttatcatgcgt 30

<210> 7  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 7  
 cacggatccc taatctgcta acaaagtttg 30

<210> 8  
 <211> 13  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 8  
 cuggauugaa aag 13

<210> 9  
 <211> 13  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 cuuuucaauc cag 13

<210> 10  
 <211> 63  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 10  
 aaaacuuugu uagcagauua guauagugag ucguauuacu gcacgcauga aaacuuuuu 60  
 uuuu 63

<210> 11  
 <211> 63  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 11  
 aaaaaaaagg uuuucaugcg ugcaguaaau cgacucacua uacuaaucug cuaacaaagu 60  
 uuuu 63

-3-

<210> 12  
 <211> 33  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> stem\_loop  
 <222> (5)  
 <223> N=0, 1, oder 2

<220>  
 <221> stem\_loop  
 <222> (11)  
 <223> N= 1

<220>  
 <221> stem\_loop  
 <222> (15)  
 <223> N=0, 1, 2, oder 3

<220>  
 <221> stem\_loop  
 <222> (19)  
 <223> N=0, 1, oder 2,

<220>  
 <221> stem\_loop  
 <222> (24)  
 <223> N=1

<220>  
 <221> stem\_loop  
 <222> (28)  
 <223> N= 1

<220>  
 <221> stem\_loop  
 <222> (30)  
 <223> N=0 oder 1

<400> 12  
 acagncagcu nuuuncugng auunaaangn cua

33

<210> 13  
 <211> 33  
 <212> RNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> stem\_loop  
 <222> (4)  
 <223> N=0 oder 1

<220>  
 <221> stem\_loop  
 <222> (6)  
 <223> N= 1

<220>  
 <221> stem\_loop  
 <222> (10)  
 <223> N=1

-4-

<220>  
<221> stem\_loop  
<222> (15)  
<223> N=0, 1 oder 2

<220>  
<221> stem\_loop  
<222> (19)  
<223> N=0, 1, 2 oder 3

<220>  
<221> stem\_loop  
<222> (23)  
<223> N=1

<220>  
<221> stem\_loop  
<222> (29)  
<223> N=0, 1 oder 2

<400> 13  
uagncnuuun aaucncagna aanagcugnc ugu

33

<210> 14  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 14  
uauagugagu cguauuacu

19

<210> 15  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
aguaauacga cucacuaua

19

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 02/00859

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/11 C07K14/515 C07H21/02 A61K38/17 C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.       |
|------------|--|-----------------------------|
| X          | DE 198 11 047 C (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG)<br>15 April 1999 (1999-04-15)<br>cited in the application<br>the whole document<br>---  | 1-18,23,<br>27-29,<br>34,35 |
| X          | WISSLER J H: "Ribokines: Biological<br>significance of RNA-structured<br>extracellular mediators (morphogens) for<br>organoid capillary pattern formation"<br>FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR<br>EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, US,<br>vol. 7, no. 7, 1993, page PA1114<br>XP002116189<br>ISSN: 0892-6638<br>abstract<br>---<br>-/-- | 11-16                       |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 May 2002

Date of mailing of the international search report

21/05/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stolz, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/00859

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | <p>WISSLER J H AND LOGEMANN E: "RNA structure and modification of copper-RNP complex of angiotropin ribokines (non-mitogenic leukocytic endothelial cell morphogens)"</p> <p>FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, US, vol. 12, no. 8, 24 April 1998 (1998-04-24), page A1463</p> <p>XP002116191</p> <p>ISSN: 0892-6638</p> <p>abstract</p> <p>-----</p> | 11-16                 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 02/00859

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| DE 19811047 C                             | 15-04-1999          | DE 19811047 C1             | 15-04-1999          |
|   |                     | CA 2322795 A1              | 23-09-1999          |
|   |                     | WO 9947561 A1              | 23-09-1999          |
|   |                     | EP 1062237 A1              | 27-12-2000          |
|   |                     | JP 2002506882 T            | 05-03-2002          |
| <hr/>                                     |                     |                            |                     |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 02/00859

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/11 C07K14/515 C07H21/02 A61K38/17 C12N1/21

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr.            |
|------------|---|-------------------------------|
| X          | DE 198 11 047 C (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG)<br>15. April 1999 (1999-04-15)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>das ganze Dokument<br>---  | 1-18, 23,<br>27-29,<br>34, 35 |
| X          | WISSLER J H: "Ribokines: Biological<br>significance of RNA-structured<br>extracellular mediators (morphogens) for<br>organoid capillary pattern formation"<br>FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR<br>EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, US,<br>Bd. 7, Nr. 7, 1993, Seite PA1114<br>XP002116189<br>ISSN: 0892-6638<br>Zusammenfassung<br>--- | 11-16                         |
|            | -/-   |                               |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*g\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Mai 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21/05/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stolz, B



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/00859

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | <p>WISSLER J H AND LOGEMANN E: "RNA structure and modification of copper-RNP complex of angiotropin ribokines (non-mitogenic leukocytic endothelial cell morphogens)"</p> <p>FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, US, Bd. 12, Nr. 8, 24. April 1998 (1998-04-24), Seite A1463</p> <p>XP002116191</p> <p>ISSN: 0892-6638</p> <p>Zusammenfassung -----</p> | 11-16              |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Abdruckzeichen

PCT/EP 02/00859

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| DE 19811047 C                                      | 15-04-1999                    | DE 19811047 C1                    | 15-04-1999                    |
|  |                               | CA 2322795 A1                     | 23-09-1999                    |
|  |                               | WO 9947561 A1                     | 23-09-1999                    |
|  |                               | EP 1062237 A1                     | 27-12-2000                    |
|  |                               | JP 2002506882 T                   | 05-03-2002                    |
| -----  |                               |                                   |                               |